



Etudes moléculaires de la diversité des communautés et populations de champignons mycorhiziens à arbuscules (Glomeromycota)

Marine Peyret Peyret -Guzzon

► To cite this version:

Marine Peyret Peyret -Guzzon. Etudes moléculaires de la diversité des communautés et populations de champignons mycorhiziens à arbuscules (Glomeromycota). Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS065 . tel-01390195

HAL Id: tel-01390195

<https://theses.hal.science/tel-01390195>

Submitted on 1 Nov 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENTS-SANTÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

UMR 1317 AGROÉCOLOGIE AGROSUP/INRA/UB POLE INTERACTION PLANTE-MICROORGANISMES
CNRS ERL 6300

UFR SCIENCES DE LA VIE, DE LA TERRE ET DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences Vie

Spécialité : Ecologie Microbienne- Agroenvironnement

Soutenue le 30 octobre 2014

© Marine PEYRET-GUZZON

“Etudes moléculaires de la diversité des communautés et populations de champignons mycorhiziens à arbuscules (*Glomeromycota*)”

Composition du jury de thèse :

Roland MARMEISSE	Directeur de Recherche, CNRS, Lyon	Rapporteur
Christophe ROUX	Professeur, Université Toulouse III	Rapporteur
Marc BUÉE	Chargé de Recherche, INRA, Nancy	Examineur
Marc-André SELOSSE	Professeur, MNHN, Paris	Examineur
Sylvain JEANDROZ	Professeur, AgroSup, Dijon	Président du Jury
Dirk REDECKER	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Directeur de thèse



Remerciements

Merci à tous ceux qui ont fait de ces quatre années une aventure agréable et pleine de très bons souvenirs !!!!

Aux membres du jury

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de prendre le temps de lire mes travaux de thèse, d'y réfléchir et de les examiner mais aussi pour de s'être déplacés en région Bourgogne : Christophe Roux (rapporteur), Roland Marmeisse (rapporteur), Marc Buée (examineur), Marc-André Selosse (examineur) et Sylvain Jeandroz (examineur).

Aux responsables administratifs

Je souhaite remercier le Conseil Régional de Bourgogne, l'université de Bourgogne et l'INRA de Dijon pour leur financement et/ou contribution matérielle. Pour leurs accueils au sein des différentes UMR auxquelles j'ai appartenues, je souhaite remercier Philippe Lemenceau (MSE et Agroécologie), Vivienne Gianinazzi-Pearson (PME) et pour leur accueil au sein du pôle Mécanismes et gestions des Interactions Plante-Microorganismes (IPM), je tiens à remercier Françoise Simon-Plas et Daniel Wipf.

Aux membres des comités de suivi de thèse

Pour leurs conseils avisés, leurs questions, leurs analyses et leurs conseils, je voudrais remercier les membres de mes comités de suivi de thèse, à savoir : Monique Gardes, Daniel Wipf et Christian Steinberg.

A mon chef, Dirk Redecker

Merci Dirk, la tempête allemande la plus adaptée à la France, pour ces quatre années passées dans une ambiance de travail stimulante même quand le moral était en Bern. De façon générale, merci pour les échanges que nous avons eus tant au niveau professionnel que personnel ! En quatre ans, je n'ai certes enrichi mon vocabulaire allemand que de deux mots (« Zwiebel » et « Tor » et ce n'est pas faute d'avoir essayé) mais j'ai eu l'occasion d'étoffer mes connaissances sur plein d'autres aspects !!!! Merci pour la liberté encadrée que tu m'as laissée, pour l'écoute attentive de mes points de vue, ta patience, ta compréhension et ton soutien dans les moments difficiles de la vie et de la thèse mais aussi pour ton long travail de corrections ! A très vite !!!!

A mon équipe, collègues et amis de l'INRA qui ont aussi subi mes angoisses

En quatre années, on en voit défiler des personnes (ce ne sont pas les titulaires qui diront le contraire) et j'ai pu faire de magnifiques rencontres qui resteront bien entendues gravées dans mon cœur !

Merci à toute l'équipe de m'avoir accueillie et accompagnée dans mon travail mais aussi dans les « à-côtés » ! Ainsi, merci au personnel de la cellule de soutien à la Recherche: Sandrine Giordana, Christine Modot, Catherine Morel, Fabienne Garcia, Sylvie Belotti, Samuel Vauchet, Pauline Hecquet, Christine Devroe, Estelle Carteret, Virginie Digonnet, Emilie Mugneret, Bernard Le Bihan, Francine Vieren, Philippe Aubert.

Merci à mes deux mamans poules du laboratoire Annie Colombet et Odile Chatagnier qui se sont inquiétées pour moi et m'ont facilité la tâche durant cette thèse. Merci aussi pour votre patience, pour votre acharnement à bien faire, pour la nourriture (carte/couscous) et surtout votre optimisme et votre bonne humeur !!! Cela a été un vrai plaisir...

Pour leur aide à l'expérimentation, merci à Bernard Alixant, Pascal Farcy et Eric Bernaud, Odile Chatagnier, Herbert Stockinger, Marie-Lara Bouffaud, Annie Colombet, Xavier Charrier, Charlène Mansuy, Nassibat Ismail, Malte Horvat et Valérie Monfort.

Merci à Jérôme Fromentin, papa poule...mais aussi le chef de la convivialité du bâtiment, notre Georges Cloney, sans qui j'aurais roupillé un paquet de fois....et bienvenue au nouveau pensionnaire de la famille Fromentin !!

Merci à tous les pensionnaires successifs des bureaux 526 et 603 : Que de beaux souvenirs avec vous !!! La vedette, Thomas Stanislas (qui a aménagé mon intérieur et m'a montré d'entrée de jeu à quoi ressemblait une fin de thèse) ; Emilie Steimetz (pour ses paroles toujours rassurantes et son intégrité) ; Lucko, Lucie Trda (The flower girl, ton esprit sportif entraînant me manque, j'espère un jour faire de l'escalade avec toi, depuis le temps) ; Nanou, langue de vipère bien assagie, Ian li kim khiook (que j'ai lâchement abandonné dans le bureau pour la rédaction....encore désolée et bon courage !!!) ; aux pouliches de compétitions pour leur délire: Joan Doidy (mon cousin pince dans son pyjama) et Terence Hill, alias Thibaud Adam et « sa femme !!! » ...pour leur accessibilité et leur simplicité. Promis je tente de venir vous voir ! ; Souki, Soukayna Hayek, la grande qui m'a donné le pouvoir de faire la chose, nanana !!!! Mais sans toi, la chose n'a pas le même goût !!! ; Marie-Lara Bouffaud pour son écoute attentive, son recul, sa compréhension de mes maladresses, ses conseils qui ont été entendus bien que parfois difficilement appliqués ! et Virginie Molinier, la première personne que j'ai appris à connaître. Merci pour ta belle personne, ta bonne humeur notamment ton rire de clef à molette si communicatif et ton accent si chantant qui met un peu de « solèlle du suud dans la brumeu dijônnèse ! ». J'espère avoir encore plein de rigolades avec toi et te souhaite le meilleur en suisse allemande avec Titi.... Et pour la suite aussi évidemment !!!.....

Merci aussi : à maman chat, comme moi, Ghislaine Recorbet pour sa douceur, son écoute, son aide, son soutien et les échanges sur le balcon... Merci de partager !!! ; à Diederik van Tuinen pour son calme, sa disponibilité, ses conseils et ses corrections ; à Christine Arnould et son dynamisme ; à Francine Javelle à la pause de 15h ; à Magdalenna Gamm pour son grand cœur et son esprit toujours ouvert ; à Ivan Sanchez ; à Iulia et Marcos et leur belle union ; à Nassima Ait Lamidi et ses gâteaux toujours excellents, bon courage à toi ! ; à Franck Robert, Vincent grandperret, Pauline Trapet, Leni Tessier, Maud Combier auxquels j'espère ne pas avoir fait trop peur.... Merci à Jean-Luc Cacas, Olivier Lamotte et leur humour en particulier leurs contrepèteries et les bons moments à la cantine ! Merci à Agnès Klinguer pour ses sourires, ses bisous et aussi pour la grenouille, prends soin de toi !!!!

Merci aussi au premier étage du bâtiment Dommergues pour leur accueil et les bons moments passés ensemble, en particulier à mon colocataire temporaire Florentin Constancias que j'ai usé de questions, à l'adorable baroudeuse qui m'a manqué pendant 6 mois, Céline Faivre-Primot (ta belle famille va me manquer), à l'amical et très très serviable Sébastien Terrat, à la formidable et trop méconnue Chachou (Charline Lecomte) mais aussi à Pierre Plassart, Vincent Tardy, Aude Locatelli, Anne-Laure Vivant et David Bru. Merci aussi à Romain Barnard et Aymé Spor pour leur conseil statistiques de dernières minutes....et encore désolée de vous avoir chauffé le cerveau en mode sangsue !

Merci à Leonardo Casieri, mon grand frère italien, à l'œil un tantinet polisson, le tombeur végétarien ! Compagnon de tous les jours : champignons, marché, d'ama, dînés, pilier des soirées dijonnaises, toujours serviable, toujours aimable ! J'aime quand tu as le sourire !!!! Un ami de tous les jours... Tu seras toujours le bienvenu chez moi où que je sois, où que tu sois ! Tanti baci !

Merci à Herbert Stockinger, qui est loin d'avoir l'herbert (cela fait longtemps que je voulais la faire) ! Merci pour tous tes enseignements ! Ton optimisme, ton sourire, nos discussions parfois philosophiques, le ramassage de champignons ainsi que tes bons gâteaux me manquent ! I wish the best for you, Magda and Mathilda Sophie !!!

A mes amis hors de Dijon qui ont supporté mon silence

Merci aux isérois natifs ou non qui ont égayés mes week-end grenoblois par leur bonne humeur et leur simplicité : Guénolnol (Guénolé Mainsant), les Trepcu (Juliette et Julien Curier), Saroule (Sarah Ancelet), barbe douce (Alexandre Appolaire) et la petite famille, les M&M&Ms (Michel Trepaut et Marlène Aguilar et le petit Maxime), guigui (Guillaume Bacques), les abdos de Monin (Guillaume Monin), Jeano et sa douceur inhérente (Jean Letort), Joe (Jonathan Veyet) et un pensée particulière à Richard (Richard Khan) sans qui je n'aurais peut-être pas été prise en thèse.

Merci à mes amis de toujours qu'ils viennent des années collège, du lycée ou de la faculté, pour être venus me voir et m'avoir soutenu à distance... Merci de me faire participer à vos vies qui s'agrandissent si vite ! Je vous aime !

Merci à ma seconde maman, Laura Raymundo-Salomé, Alfredo Raymundo et le petit Léo pour votre accueil, votre soutien et les fondants !!! Merci à Elodie Brehier-Kustova, Wil Brehier et le petit Tancrede, j'ai été ravie d'avoir pu participer à votre union durant cette thèse ! Merci à Pioupiou (Sébastien Pontio), Alys Pontio, la petite Emily et le petit Edward, loin de yeux mais tout près du cœur...

Merci à Coit (François Montenvert), Dada (Linda Montenvert) et le petit Abel ; Merci à Didou (David Weisenburger), Galou (Gaëlle Weisenburger), vos mariages donnent du baume aux lèvres et au cœur ; Merci à Vinc (Vincent Tanguy) et sa compagne Claire. Le noyau dur de Paris 7 a laissé des traces sur ma cursive et dans l'appart (preuve à l'appui) !!! Merci aussi à Coco (Colin Guillemant), Cecile Morelle, Nanaism (Anaïs Sokil) et Nanette (Anne Macaire)

Merci ma Kik (Kristina Bertulletti) ! Merci Fanynou (Fanny Jaulmes), mon amour (Laurent Mendy), Pilou (Philippe Brandon), n°1 (François Laur), Swann Laverdure, Laurence Féraud, Samy (Samuel Poubeau), Ana (Ana-Maria).... Pour votre disponibilité et votre amitié ! La trentaine vous va si bien....pour ceux que cela concerne !

A ma vaste famille... Je fais sobre car les mots ne suffisent pas...

Un merci général à ma vaste famille pour leur encouragement, leur écoute, leur inquiétude, leur patience, bref leur soutien et parfois financier aussi !!

Merci à mes cousins et plus particulièrement à Astrid, Dan, Didi, Lio, Raphiki à mes oncles et tantes notamment Berny, Gaby, Liliane, Philippe, Yolande, Suzon et Charly et un grand merci à mimi Lili !!!! Vous êtes toujours là dans mon cœur et vous voir est toujours un ressourcement... Merci aussi à Riccardo, Andrée et Sylvie !

Merci aussi à Isabelle, Philippe, Raynald, Kikou, Maurisette, Laure-Justine et Cléopée !

Merci à Monique Dugas, une ligne à part pour une personne à part... on ira danser toutes les deux !

Et en particulier mes parents qui m'ont téléphoné parfois tous les jours....

Je tiens à remercier le papou, Michel Peyret, à qui je dois le magnifique short orange que tout le monde m'envie au labo et ailleurs... et beaucoup d'autres choses !!!!

Enfin, merci à ma maman, LA mounette, Joëlle Guzzon ! Merci pour tout depuis tant d'années...et dans ce cadre particulier pour la correction des phautes orthographiques....

Une thèse à Dijon mais à cœur ailleurs...

Merci du plus profond de mes tripes à mon compagnon, Romain Talon, Nouto, le chat parisien, misonnais, grenoblois et à présent « Oxfordien »... On en aura vécu des choses ensemble ! Ces quatre années loin de toi m'ont appris que la vie est plus belle à tes côtés !

Je vous souhaite à tous le meilleur que ce soit professionnellement ou personnellement !

Liste des abréviations

Abrégés anglais	Abrégés français	Significations
DNA	ADN	Acide désoxyribonucléique
rDNA	ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
RNA	ARN	Acide ribonucléique
rRNA	ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ITS	ITS	Espaceur transcrit interne
LSU	LSU	Gène codant pour la grande sous-unité ribosomique (sous entendu nucléaire)
mtLSU	mtLSU	Gène codant pour la grande sous-unité ribosomique mitochondriale
RFLP	RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
T-RFLP	T-RFLP	Polymorphisme de longueur des fragments terminaux de restriction
SSCP	SSCP	Polymorphisme de conformation simple brin
TGGE	TGGE	Electrophorèse sur gel à gradient de température
DGGE	DGGE	Electrophorèse sur gel avec gradient dénaturant
AMF	CMA	Champignons mycorhiziens à arbuscules
SSU	SSU	Petite sous-unité ribosomique (sous entendu nucléaire)
RPB1	RPB1	Gène codant pour la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II
RPB2	RPB2	Gène codant pour la seconde plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II
dNTP	dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides (ATP,TTP,CTP et GTP).
ATP	ATP	Adénine tri-phosphate
CTP	CTP	Cytosine tri-phosphate
GTP	GTP	Guanine tri-phosphate
TTP	TTP	Thymine tri-phosphate
OTU	OTU	Unité taxonomique opérationnelle
MT	MT	Taxon moléculaire
Pth1	pth1	Famille de transporteurs de phosphore inorganique des plantes
GmFOX2	GmFOX2	Gène codant pour une protéine de la bêta-oxidation
GmTOR2	GmTOR2	Gène codant pour une protéine impliquée dans le cycle cellulaire
vs.	vs.	<i>versus</i>
cf.	cf.	<i>confer</i>
i.e.	i.e.	<i>id est</i>
e.g.	e.g.	<i>exempli gratia</i>

Lexique

Abiotique	Inanimé, non vivant.
Agriculture	Culture des sols afin d'obtenir les produits d'alimentation.
Arbuscule	Structure d'échange en forme d'arbuste de la symbiose mycorhizienne à arbuscules se formant au sein des cellules racinaires de la plante hôte suite à la pénétration non dégradante d'un hyphes fongique.
Biotique	Se dit des facteurs liés à l'activité des êtres vivants et agissant sur la distribution des espèces animales et végétales d'un biotope donné.
Biotrophe	Se nourrissant aux dépens d'un être vivant.
Biocénose	Composante vivante de l'écosystème. Ensemble des organismes vivants interactifs (plantes, animaux, micro-organismes) coexistant dans un espace défini.
Biotope	Composante abiotique de l'écosystème. Aire géographique réduite ayant des conditions climatiques et biologiques définies. Revient à la notion de niche écologique.
Biome	Ensemble d'écosystèmes caractérisés par un type de climat donné.
Communauté	Ensemble des espèces coexistant dans un environnement donné.
Ecosystème	Système écologique complexe d'interactions entre la biocénose et le biotope qui le composent.
Ectotrophe	Se dit d'un mycorhize vivant en symbiose avec les racines d'un arbre, mais dont le mycélium entoure les racines sans pénétrer à l'intérieur.
Edaphique	Relatif aux rapports entre les êtres vivants et les sols. Se dit de facteurs écologiques liés au sol (pH, humidité, concentrations en éléments minéraux, etc...).
Locus	Endroit précis où un gène est situé sur un chromosome.
Osmotrophie	Fait de se nourrir d'éléments en solution absorbés à travers la membrane cellulaire.
Services écosystémiques	Ensemble des services rendus par les écosystèmes à l'Humanité.
Strigolactones	Hormone végétale impliquée dans la médiation chimique dans les interactions entre plantes et leurs champignons mycorhiziens.
Trophique	Relatif à la nutrition des tissus organiques.
Variants	Formes ou versions différentes.

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	5
Lexique	6
Table des matières	7
Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	13
Introduction générale.....	15
Références bibliographiques de l'introduction générale :.....	18
Chapitre 1 - Synthèse bibliographique.....	19
I. Importance des champignons dans les écosystèmes	21
A. Généralités sur les champignons.....	21
1. Position phylogénique des champignons.....	21
2. Caractéristiques des champignons	22
3. Mode de vie des champignons	23
B. Les différentes symbioses mycorhiziennes.....	23
II. Les champignons mycorhiziens à arbuscules, CMA.....	26
A. Cycle de vie, structures et fonctions des CMA.....	26
1. Cycle de vie des CMA.....	26
2. Structures et fonctions des CMA	27
B. Taxonomie et phylogénie des CMA	28
1. Evolution de la taxonomie et de la phylogénie des CMA.....	28
2. Taxonomie et phylogénie actuelle	29
C. Aspects génétiques chez les CMA.....	31
1. Génétique des CMA.....	31
2. Notions imbriquées : communauté, espèce, population et individu	32
III. Place des CMA dans l'écosystème	34
A. Influence des CMA sur l'écosystème	34
1. Rôle nutritif des CMA vis à vis des plantes.....	34
2. Rôle protecteur des CMA vis à vis des plantes.....	36
B. Influence des facteurs écologiques sur les CMA.....	36
1. Rôle des pratiques culturales sur les CMA.....	37
2. Autres facteurs influençant les CMA	38
IV. Evolution des outils pour l'étude de la diversité des CMA	39
A. Différents échantillons pour différentes questions	39
B. De la morphologie aux méthodes de séquençage haut-débit	40
C. Les différents marqueurs génétiques disponibles	42
1. Echelle interspécifique.....	43
2. Echelle intraspécifique.....	45
V. Objectifs de la thèse.....	46
Références bibliographiques de la synthèse bibliographique	48

Chapitre 2 - Etude de l'impact de la fertilisation et de la perturbation du sol sur les structures, en symbiose, de la communauté de CMA et des populations de <i>Rhizophagus irregularis</i>.	61
Introduction au Chapitre 2	63
Effects of short-term soil disturbance and fertilization on arbuscular mycorrhizal fungal communities and <i>Rhizophagus irregularis</i> populations in a grassland	65
Abstract	65
I. Introduction	66
II. Material and methods	68
A. Field site and experimental design	68
B. Harvest and DNA extraction	69
C. Amplification of the rpb1 gene and 454-pyrosequencing	69
D. Reference database	69
E. Sequence analyses and OTU determination	70
F. Statistical analysis of pyrosequencing data	75
G. Amplification of mtLSU and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	75
H. RFLP statistical analysis	76
III. Results	76
A. Sequences, OTUs and Molecular Taxa (MTs)	76
B. Diversity	77
C. Shifts in glomeromycotan community composition	79
D. <i>Rhizophagus irregularis</i> population study	82
IV. Discussion	83
A. AMF community shifts	85
B. Population structure of <i>Rhizophagus irregularis</i>	86
Conclusions	87
Acknowledgements	87
Conclusion du Chapitre 2	88
Références bibliographiques du Chapitre 2	89
Chapitre 3 - Etude de l'impact des pratiques culturales sur les communautés des CMA à l'échelle "de parcelles"	95
Introduction au Chapitre 3	97
Arbuscular Mycorrhizal Fungal (AMF) molecular species in arable land are a subset of adjacent grassland communities.	98
Abstract	99
I. Introduction	100
II. Material and methods	101
A. Field sites and sampling	101
B. DNA extraction and purification	101
C. PCR amplification and pyrosequencing	101
D. Sequences and data analyses	102
III. Results	103

A. Sequences/OTUs/MTs/diversity and richness	103
B. Land use and sample type effects on AMF diversity	105
C. AMF community changes	107
IV. Discussion	108
A. Influence of land use type	109
B. Sample type	109
C. Indicator species	110
Conclusion	112
Acknowledgements	112
Conclusion du Chapitre 3	113
Références bibliographiques du Chapitre 3	114
Chapitre 4 - Etude de l'impact des pratiques agricoles sur les communautés des CMA à plus vaste échelle.....	117
Introduction au Chapitre 4	119
Structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities in various French agricultural soils.	121
Abstract	121
I. Introduction	122
II. Materials and Methods	123
A. Sampling and DNA extraction and purification	123
B. PCR amplification and pyrosequencing.....	123
C. Sequence analyses and OTU determination	124
D. Statistical analysis data.....	125
III. Results	126
A. Sequences, OTUs, MTs diversity and richness	126
B. AMF communities composition shifts among sampling sites	129
IV. Discussion.....	131
Conclusion	133
Acknowledgments	133
Conclusion du Chapitre 4	134
Références bibliographiques du Chapitre 4.....	135
Chapitre 5 - Conclusion générale et perspectives	139
I. Type d'usage de sol	142
II. Pratiques culturales	142
A. Retournement du sol.....	142
B. Fertilisations	143
C. Rotations culturales	144
III. Les contraintes de l'expérimentation au champ.....	144
A. Le système expérimental	144

B. L'échantillonnage	145
C. Les techniques de biologie moléculaire.....	145
D. Les analyses bioinformatiques	146
IV. Etudes à poursuivre	147
A. Espèces indicatrices.....	147
B. Structuration nationale des communautés de CMA.....	147
C. Dynamique de la diversité des CMA	148
D. Prairies: réservoir de biodiversité.....	148
Références bibliographiques de la discussion générale et perspectives	135
Annexe 1 - La plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II en tant que nouveau gène marqueur pour l'étude, au champ, des assemblages de champignons mycorrhiziens à arbuscules.	153
The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field	154
Abstract.....	155
I. Introduction	156
II. Material and Methods.....	157
A. Fungal reference cultures.....	157
B. DNA Extraction	157
C. PCR reference dataset and Sanger sequencing	159
D. RPB1 reference dataset 1.....	163
E. RPB1 reference dataset 2	163
F. Field site and sampling	165
G. DNA extraction, PCR and pyrosequencing	165
H. 454 sequence editing and analysis.....	167
I. Community diversity analysis	171
III. Results.....	171
A. RPB1 as a marker gene in the <i>Glomeromycota</i>	171
B. 454 Community analysis.....	172
1. Sequences/OTUs	172
2. Community analysis based on UniFrac distance.....	177
3. Taxon identification and distribution.....	177
IV. Discussion	182
Acknowledgments.....	185
Références bibliographiques de l'Annexe 1	186
Résumé de la thèse/ Thesis abstract.....	189

Liste des Figures

Introduction générale:

Figure 1: Rôle de la biodiversité dans le changement global	16
Figure 2: Les différents types d'interactions biotiques entre deux espèces	16
Figure 3: Augmentation du nombre de publications scientifiques sur le sujet	18

Chapitre 1 – Synthèse bibliographique:

Figure 1.1: Phylogénie des Opisthocontes	21
Figure 1.2: Les principales symbioses mycorhiziennes	24
Figure 1.3: Cycle de vie d'un CMA	27
Figure 1.4: Phylogénie actuelle des <i>Glomeromycota</i>	30
Figure 1.5: Les différentes amorces utilisées pour l'amplifier l'ADNr codant pour les molécules d'ARNr	44
Figure 1.6: Schéma de la partie amplifiée du gène RPB1	45
Figure 1.7: Emplacement du gène marqueur mtLSU au sein du génome mitochondrial	46
Figure 1.8: Structure de la partie amplifiée du gène marqueur mtLSU	46

Chapitre 2 - Etude de l'impact de la fertilisation et de la perturbation du sol sur les structures, en symbiose, de la communauté de CMA et des populations de *Rhizophagus irregularis*:

Figure 2.1: Schematic representation of the experimental set-up used	68
Figure 2.2: Maximum likelihood reference tree of RPB1 sequences used	74
Figure 2.3: Accumulation curves analyses of observed OTU numbers	76
Figure 2.4: Mean Shannon index differences based on species MTs across treatments	77
Figure 2.5: Non-metric Multidimensional Scaling ordination of AMF community composition	80
Figure 2.6: Mean relative abundance as percentage of the different species-, genus- and family-level MTs in the community	81
Figure 2.7: Combined diagram of relative abundance of the three RFLP genotype groups of <i>Rhizophagus irregularis</i> species in the community	82

Chapitre 3 - Etude de l'impact des pratiques culturales sur les communautés des CMA à l'échelle "de parcelles":

Figure 3.1: Accumulation curves analyses based on species-level molecular taxa	104
Figure 3.2: Comparaison of mean Shannon index, mean Operational Taxonomic Unit number, Mean Chao1 index and Mean species-level Molecular Taxa number among treatments	105
Figure 3.3: Principal Coordinates Analysis based on species-level Molecular Taxa Bray-Curtis matrix	106

Figure 3.4: Venn diagram representing Molecular Taxa number shared among treatments.....	107
Figure 3.3: Venn diagram representing Molecular Taxa number among land use type depending on sample type.	107

Chapitre 4 - Etude de l'impact des pratiques agricoles sur les communautés des CMA à plus vaste échelle:

Figure 4.1: Accumulation curves analyses based both on OTUs and genus-level MTs.....	126
Figure 4.2: Geographic position of samples after subsampling at 1,000 sequences.	127
Figure 4.3: Bar chart of mean alpha diversity, expressed by Shannon index calculated based on OTUs, across to land use type	129
Figure 4.4: Three-dimensional Non-metric Multidimensional Scaling analysis based on Bray-Curtis abundance distance matrix of OTUs	130

Chapitre 5 - Conclusion générale et perspectives:

Figure 5.1: Type d'occupation des sols du territoire français selon la grille du RMQS	141
---	-----

Annexe 1 – La plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II en tant que nouveau gene marqueur pour l'étude, au champ, des assemblages de champignon mycorhiziens à arbuscules:

Figure A.1: Analysis of structure and variability of partial rpb1 genes in the longer reference dataset 1.	159
Figure A.2: RAxML phylogenetic tree based on the exon of the fragment RPB1-Ac and RPB1-DR1210.....	164
Supplementary Figure A.1: Overview of long-term tillage experimental field site in Tänikon (Switzerland).....	165
Supplementary Figure A.2: Amplification overview of the 454 experiment.	166
Supplementary Figure A.3: Schematic workflow of the 454 experiment.	168
Supplementary Figure A.4: EPA-RAxML tree showing OTUs and reference sequences.	169
Supplementary Figure A.5: Tree of reference sequences and environmental sequences representative for OTUs	170
Figure A.3: Barcode gap analysis based on K2P distances of the RPB1 fragment: a. RPB1-Ac to RPB1-DR1210r and b. RPB1-160f to RPB1-DR1210r.	172
Supplementary Figure A.6: Rarefaction curves based on number of OTUs for the three treatments.....	173
Figure A.4: Principal Coordinates Analysis of: a. weighted UniFrac distances; b. unweighted UniFrac distances. ...	177
Figure A.5: Relative phylogenetic taxon distribution in the different treatments and plots.....	178
Supplementary Figure A.7: Taxon distribution summarized by treatment.....	178

Liste des Tableaux

Chapitre 2 - Etude de l'impact de la fertilisation et de la perturbation du sol sur les structures, en symbiose, de la communauté de CMA et des populations de *Rhizophagus irregularis*:

Table 2.1: Sequences used for the RPB1 reference tree.....	71
Table 2.2: Number of sequences found for species-level MT after sub-sampling at 1,400 sequences	78
Table 2.3: Results table of nested linear mixed model showing effect of nitrogen and phosphorus fertilizations within disturbance treatments.	77
Table 2.4: Results table of MANOVA with 2,000 permutations based on Bray-Curtis species-level MTs distance matrice depending on the treatments tested.....	79
Table 2.5: Results table of p-values indicator species analysis based on species-level MTs	80
Table 2.6: RFLP profile patterns of the mitochondrial rRNA subunit gene region from root-colonizing <i>Rhizophagus irregularis</i>	83

Chapitre 3 - Etude de l'impact des pratiques culturales sur les communautés des CMA à l'échelle "de parcelles":

Tableau 3.1 : Planning des différentes modalités de cultures employées sur le site expérimental de l'ORE de Lusignan.....	97
Table 3.2: Summary table of the number of Operational Taxonomic Units, Molecular Taxa and sequences per sample before and after subsampling 3,000 sequences threshold and diversity indices	103
Table 3.3: Number of sequences belonging to each Molecular Taxa (MT) identified after subsampling	104
Table 3.4: Mean soil parameters among grassland and culture land use types.....	105
Table 3.5: Tables of significant p-values for indicator species identified and significant abundance variations among treatments using Wilcoxon test.	108

Chapitre 4 - Etude de l'impact des pratiques agricoles sur les communautés des CMA à plus vaste échelle:

Table 4.1: Details for all Primers used and MID sequences used in the 454 studies.	125
Table 4.2: Summary table of number of samples, OTUs and MTs after subsampling to the four thresholds: 500, 1,000, 1,600 and 2,000 sequences.	127
Table 4.3 : Distribution of genus-level MTs across samples.....	128
Table 4.4: Nested ANOVA and ANCOVA results of land use and cultural practices within land use type effects on Shannon diversity index based on OTUs.....	129

Annexe 1 – La plus grande sous-unité de l’ARN polymerase II en tant que nouveau gene marqueur pour l’étude, au champ, des assemblages de champignon mycorhiziens à arbuscules:

Table A.1: Biological materials used for the reference dataset.	157
Supplementary Table A.1: Primers and PCR conditions used for the reference datasets.	160
Supplementary Table A.2: Details for all Primers used in the 454 studies.....	167
Supplementary Table A.3: OTUs found in the different samples, with their toxonomic assignment.	174

Introduction générale

« Biodiversity -the extraordinary variety of ecosystems, species and genes that surround us- is our life insurance, giving us food, fresh water and clean air, shelter and medicine, mitigating natural disasters, pests and diseases and contributes to regulating the climate. Biodiversity is also our natural capital, delivering ecosystem services that underpin our economy. » In « Our life insurance, our natural capital: an EU biodiversity strategy to 2020 », *Communication de la Commission européenne*, à Bruxelles en 2011.

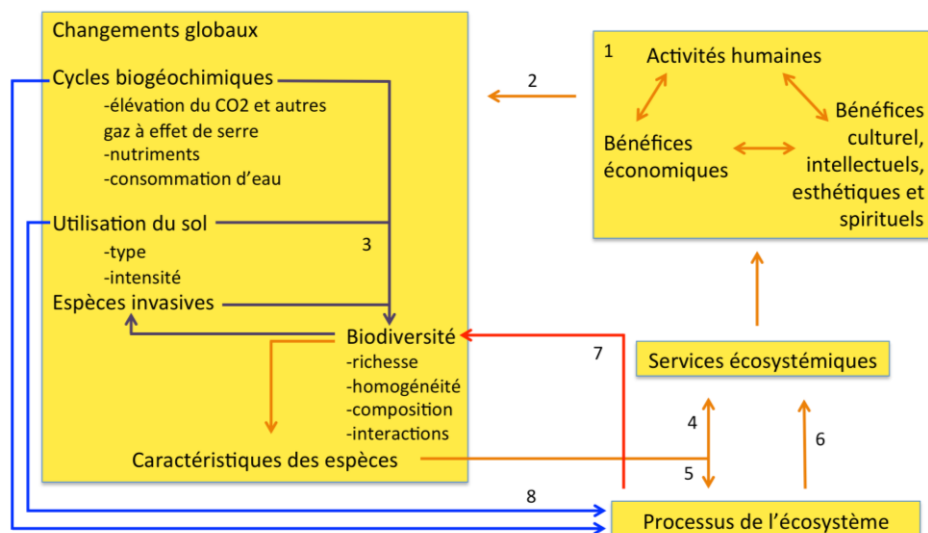


Figure 1 : Rôle de la biodiversité dans le changement global, tirée de Chapin *et al.* (2000). Les activités humaines motivées par des objectifs économiques, culturels, intellectuels, esthétiques et spirituels (1) engendrent, à présent, des changements environnementaux et écologiques d'importances globales (2). Ces changements, par la variété de leurs mécanismes, contribuent aux changements de biodiversité ce qui affecte en retour la sensibilité de la biodiversité aux espèces invasives (3, flèches violettes). Les changements de biodiversité par le biais d'un changement des caractéristiques des espèces présentes peuvent avoir des conséquences directes sur les services écosystémiques (4) et, de ce fait, sur l'économie et les activités sociales humaines (4). De plus, ces changements peuvent influencer les processus de l'écosystème (5). Des processus écosystémiques altérés peuvent jouer sur les services écosystémiques dont bénéficie l'humanité (6) et en retour affecter plus avant la biodiversité (7, flèche rouge). Les changements globaux pourraient aussi affecter directement les processus écosystémiques (8, flèches bleues). Selon les circonstances, ces effets directs pourraient être plus importants que les effets induits par un changement de diversité. Nous avançons que les coûts de la perte de diversité biotique, bien que classiquement considérés comme étant séparés du bien-être humain, devraient être reconnus comme partie intégrante des coûts et bénéfices des activités humaines.

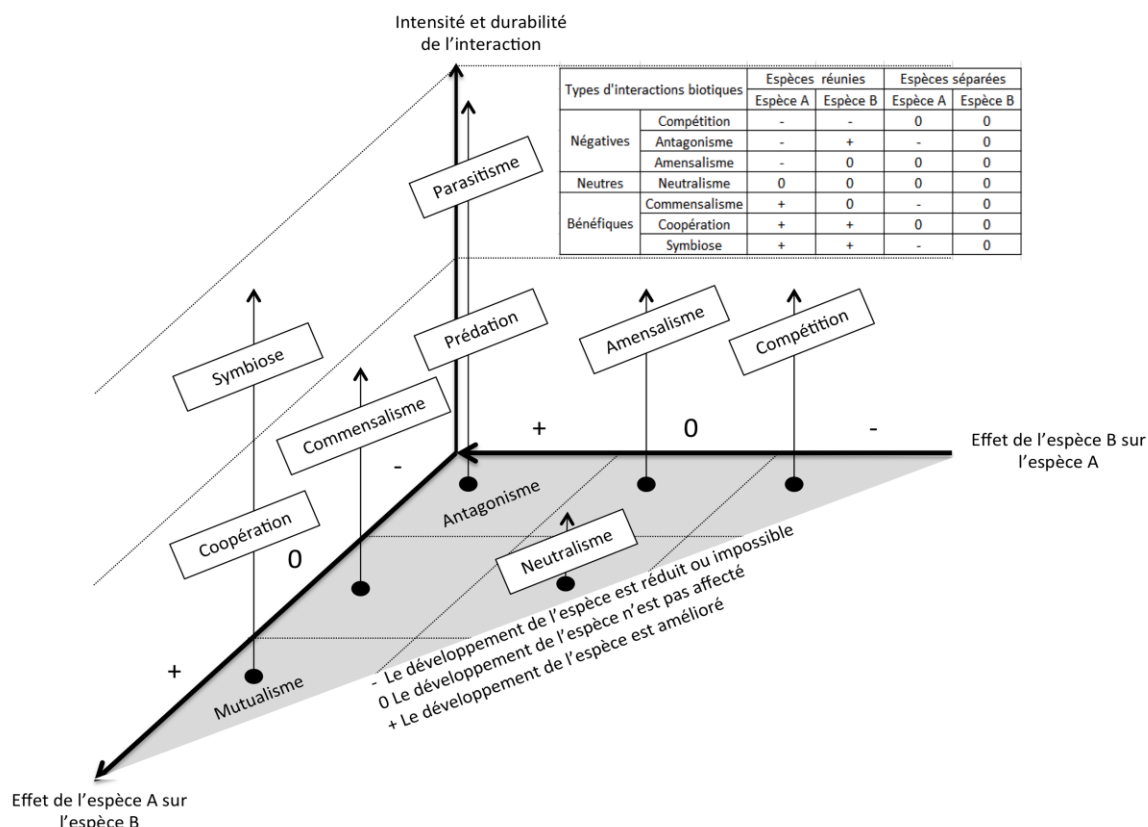


Figure 2 : Les différents types d'interactions biotiques théoriques possibles entre deux espèces (A et B) au sein d'un écosystème. Figure adaptée de Choler (2002).

Depuis son apparition, il y a 16 000 ans lors de la révolution néolithique, l'agriculture n'a eu de cesse d'évoluer afin de répondre aux besoins alimentaires de l'Homme qui se sédentarise. Cette évolution est passée de la domestication des plantes à l'élaboration de pratiques culturelles. Ces dernières se sont intensifiées à la fin de la seconde guerre mondiale pour répondre notamment aux besoins de survie des populations humaines de façon locale (en France) puis mondiale. Ces gains de productivité ont été apportés par la mécanisation agricole, l'utilisation d'intrants chimiques (fertilisants ou pesticides) et par une sélection variétale. C'est ainsi qu'est né le concept d'agriculture intensive. Suite à des décennies de pratiques agricoles de ce type, les premiers constats écologiques relèvent des conséquences alarmantes de certaines de ces pratiques intensives en Europe. En effet, il est souligné une érosion hydrique des sols, une contamination non seulement des sols mais aussi des eaux souterraines par les fertilisants et les pesticides ainsi qu'une perte de diversité des communautés animales et végétales dans les agroécosystèmes. Il est alors question de 6^{ème} extinction majeure de l'Histoire avec un taux d'extinction 100 à 1000 fois supérieur à celui des crises géologiques. Cette perte de biodiversité a été qualifiée comme étant, pour l'Homme, une perte directe de services écosystémiques, à savoir une perte des services rendus par l'écosystème (Figure 1). La prise de conscience des enjeux que soulève la perte des services écosystémiques, alliée à une connaissance grandissante du fonctionnement des écosystèmes agricoles, ont alerté les instances politiques. Forte de ces constats, la Politique Agricole Commune (PAC européenne) fixe un nouvel objectif : produire durablement en diminuant l'impact de l'Homme sur les écosystèmes. Ce principe de durabilité vise à préserver les ressources des sols agricoles en limitant les effets néfastes des pratiques culturelles tout en maintenant une certaine productivité. La diminution des intrants ainsi qu'une meilleure compréhension du fonctionnement des systèmes agricoles est alors souhaitée. C'est de cette façon qu'en 1992, la PAC instaure la mise en place de jachères subventionnées qui vise à enrayer l'érosion des sols et restaurer la biodiversité en remodelant le paysage agricole.

D'autre part, une augmentation des connaissances en ce qui concerne les agro-écosystèmes est prônée, comme l'atteste la création de l'Institut National de Recherche Agronomique en 1946. Or, le fonctionnement des agroécosystèmes, comme les autres écosystèmes, est intimement lié aux interactions biotiques et abiotiques qui s'y déroulent. En effet, celles-ci peuvent être de trois grands types : délétères pour l'un ou les deux organismes (compétition, amensalisme, antagonisme), neutres (neutralisme) ou encore bénéfiques pour l'un des partenaires, ou les deux (mutualisme, commensalisme), Figure 2. Par conséquent, un intérêt grandissant s'est porté sur les interactions entre les plantes et leur compartiment nourricier, le sol. C'est ainsi que de nombreuses études ont été menées pour comprendre comment les autres communautés du sol (bactéries et champignons) interagissaient avec les plantes. L'étude des relations mutualistes, qui caractérisent les associations bénéfiques réciproques entre deux espèces, a donc connu un essor puisqu'elles sont favorables aux plantes et fournissent des services écosystémiques. Deux types de mutualisme sont distingués : la coopération et le mutualisme. Le terme de coopération est souvent utilisé pour décrire des relations de courte durée où les espèces peuvent vivre indépendamment de l'une de l'autre. La symbiose, quant-à-elle, est généralement définie comme une relation étroite et durable souvent obligatoire car au moins une des deux espèces en symbiose nécessite l'autre pour survivre à un stade de vie donné (Selosse 2000 ; Garbaye, 2013).

Parmi les relations mutualistes, l'une d'entre elles aurait joué un rôle crucial dans l'émergence des plantes sur le milieu terrestre : la symbiose mycorhizienne à arbuscules. Cette dernière s'effectue entre un champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) et la majorité des plantes terrestres, y compris celles cultivées. Ces CMA sont actuellement connus pour améliorer la nutrition minérale des plantes leur procurant par ce biais non seulement une meilleure productivité mais aussi une meilleure santé. De ce fait, le nombre d'études visant à comprendre l'établissement, le maintien et le fonctionnement des communautés de ces champignons sous l'influence des pratiques culturales a augmenté ces dernières années, comme l'atteste la Figure 3. C'est dans ce contexte que se situe ma thèse qui a pour objectif général de participer à l'amélioration de la compréhension de la structuration écologique de la diversité des CMA et du fonctionnement des facteurs qui influencent cette diversité. C'est par l'enrichissement de ce type de connaissances qu'une meilleure gestion des services écosystémiques des CMA en agriculture durable sera possible et de ce fait, je l'espère, mes travaux de recherche y participeront.

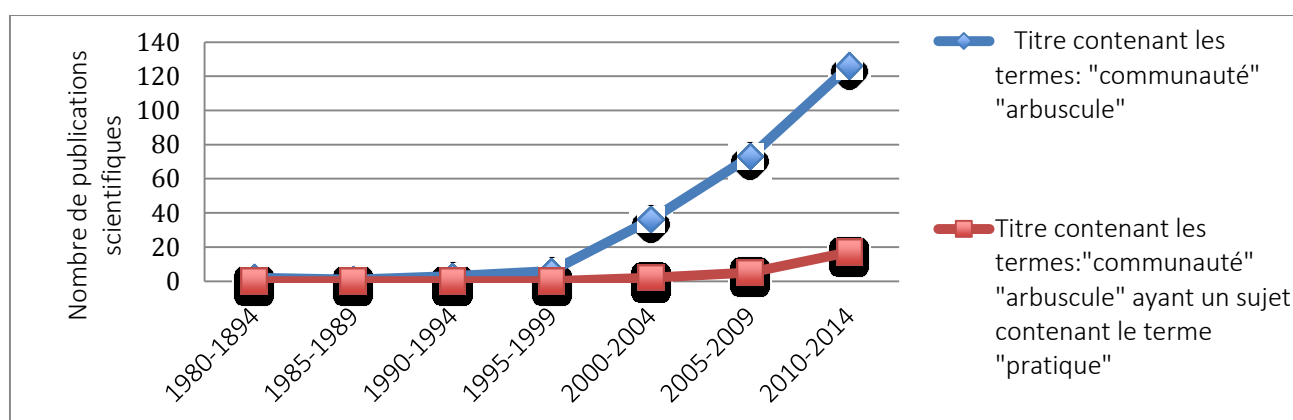


Figure 3 : Augmentation du nombre de publications scientifiques entre 1980 et mai 2014 dans la base de données bibliographiques « Web of Science » (<http://sub3.webofknowledge.com/>) contenant les termes anglais « community » et « arbuscule » (en bleu) et « community », « arbuscular » et « practice » (en rouge).

Le présent manuscrit est articulé en cinq parties. La première introduira le contexte de mes travaux au sein des avancées actuelles de la recherche sur le sujet. Les chapitres 2, 3 et 4 présenteront les travaux de recherches que j'ai menés durant mes quatre années de thèse. Enfin, la dernière partie s'attachera à donner une vue d'ensemble non seulement de l'apport de mes résultats sur le sujet mais aussi des perspectives qu'offrent ces études.

Références bibliographiques de l'introduction générale :

- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, *et al.* (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*. 405. 6783 : 234-242.
DOI : [10.1038/35012241](https://doi.org/10.1038/35012241)
- Choler P (2002) Thèse intitulée : La distribution des pelouses alpines à *Carex curvala* (s.l.) en Europe : essai de biogéographie fonctionnelle et évolutive. Université Josef Fourier, Grenoble I.
- Garbaye J (2013) La symbiose mycorhizienne. Edition Quae.
- Selosse MA (2000) La symbiose : structures et fonctions, rôle écologique et évolutif. Edition Vuibert.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

I. Importance des champignons dans les écosystèmes

Les microorganismes représentent la majorité des organismes vivants du compartiment sol et constituent ainsi une importante part de la diversité génétique de la planète. De par leur variété de modes de vie, les champignons sont omniprésents dans les écosystèmes terrestres. En effet, un gramme de sol contient de 10^{10} à 10^{11} bactéries (Horner-Devine *et al.*, 2003), de 6 000 à 50 000 espèces bactériennes (Curtis *et al.*, 2002) et jusqu'à 200 mètres d'hyphes fongiques (Leake *et al.*, 2004). Le rôle clé qui leur est attribué est dû aux influences qu'ils peuvent avoir dans les processus chimiques qui régissent les écosystèmes : l'acquisition des éléments nutritifs pour les plantes (Smith et Read, 2008), les cycles géochimiques comme celui de l'azote (Kowalchuk et Stephen, 2001) ou celui du carbone (Hogberg et Hogberg, 2002).

A. Généralités sur les champignons

1. Position phylogénique des champignons

Auparavant, les champignons étaient regroupés au sein des Plantes car ils partagent des caractéristiques morphologiques communes. La création du règne fongique en lui-même sous le nom de *Mycota* date de 1969 (Whittaker, 1969). Il était basé sur des caractères particuliers comme l'absence d'amidon ou de chlorophylle. Son nom actuel, *Fungi*, provient quant à lui du latin « *Fungus* » signifiant champignon (Bartling, 1830). Sur la base de méthodes de classification structurale alliée à l'apparition des méthodes moléculaires, il a été proposé que les champignons partageaient probablement un ancêtre commun avec le règne animal (Wainright *et al.*, 1993). Cependant, ces deux règnes ont finalement été diagnostiqués comme étant frères (Baldauf, 1999; Baldauf et Palmer 1993). Ainsi, avec les animaux, les *Fungi* appartiennent au groupe des Opisthocontes (Baldauf, 1999) au sein de l'Empire des Eucaryotes, Figure 1.1 partie de gauche.

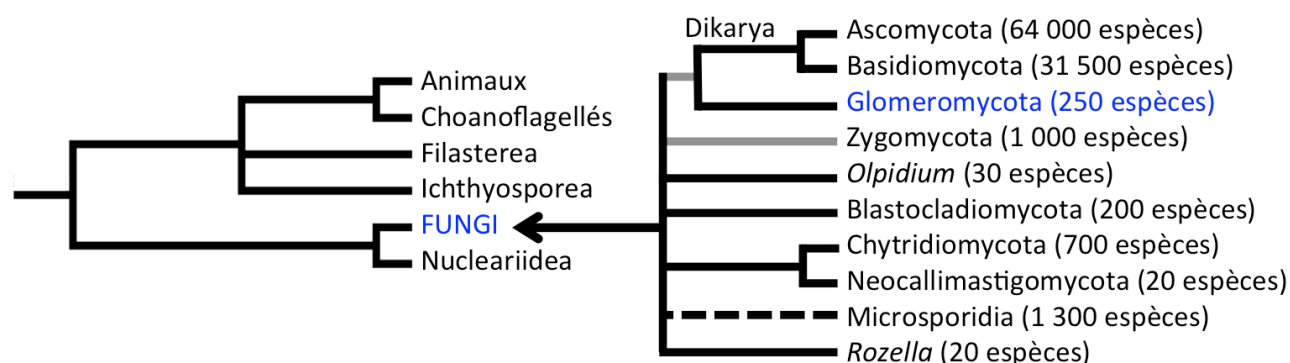


Figure 1.1: Phylogénie modifiée des Opisthocontes à partir de (Keeling *et al.*, 2009; Blackwell *et al.*, 2012). Les branches grises montrent que la monophylie de ce groupe est incertaine. La branche en pointillés indique que la position phylogénétique de ce groupe n'est pas sûre (*incertae sedis*).

2. Caractéristiques des champignons

Les champignons sont des Eucaryotes qui peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. Ils ont pour caractéristiques d'avoir une paroi cellulaire contenant de la chitine, de l'hémicellulose et des polysaccharides (glucanes (Latgé, 2010)). Ils sont dépourvus de plastides et /ou de chlorophylle et par conséquent incapables de photosynthèse. Les *Fungi* possèdent des hyphes qui constituent leur appareil végétatif, appelé thalle ou mycélium. Ces hyphes qui peuvent être cloisonnés ou non (respectivement dits septés ou aseptés), assurent leur nutrition par absorption et plus précisément par osmotrophie. Leur cycle de vie possède une phase sexuée et/ou asexuée.

A l'heure actuelle, environ 99 000 espèces sont regroupées dans le règne fongique bien que des estimations parlent de près de cinq millions d'espèces fongiques (Blackwell, 2011). Ces espèces au sein du règne des *Fungi* sont regroupées en huit clades et un sous-règne (Figure 1.1, partie de droite) : le sous-règne des *Dikarya* (Hibbett *et al.*, 2007) qui comprend lui-même les phyla des *Basidiomycota* et *Ascomycota* ; les *Glomeromycota*, les « Zygomycètes », les *Chytridiomycota*, les *Blastocladiomycota*, les *Neocallimastigomycota* les *Microsporidia*, *Olpidium* et *Rozella*. Cependant, cette classification est toujours en évolution et en discussion. Par exemple, le placement des *Microsporidia* au sein des *Fungi* est toujours disputé (Liu *et al.*, 2006; Keeling et Fast, 2002). Récemment, sur la base de 35 gènes en simple copie dans le génome, de nouveaux liens phylogénétiques au sein des *Fungi* ont été proposés (Lin *et al.*, 2014) plaçant les *Glomeromycota* comme plus proches des *Mucoromycotina* que des *Dikarya*.

Les *Microsporidia* sont des pathogènes unicellulaires. Les 1200 espèces de *Microsporidia* possèdent des morphologies et des génomes réduits (James *et al.*, 2006). Ces espèces sont décrites comme des parasites obligatoires d'Eucaryotes allant du protiste aux vertébrés. Ces parasites transfèrent le contenu de leurs spores via un tube dans le cytoplasme de leurs hôtes.

Les *Chytridiomycota*, les *Blastocladiomycota* et les *Neocallimastigomycota* possèdent des spores mobiles (zoospores) puisque ayant un flagelle. Ils peuvent être saprophytes ou parasites et sont considérés comme la base évolutive des champignons.

Olpidium et *Rozella* sont des champignons endoparasites dont la position phylogénétique reste incertaine à ce jour (James *et al.*, 2006).

Le sous-règne des *Dikarya* comprend les *Basidiomycota* et les *Ascomycota* qui sont les champignons les plus connus du grand public car certaines espèces sont appréciées pour leurs qualités gustatives tandis que d'autres espèces sont utilisées en pharmacologie. Ces champignons peuvent aussi causer des maladies attaquant les cultures. Leur nom provient des « structures » généralement sexuées, qui portent leurs spores : les basides pour les *Basidiomycota* et les asques pour les *Ascomycota*. Il s'agit des deux phyla contenant le plus d'espèces puisqu'un total de plus de 95000 espèces ont été décrites à ce jour. Les *Basidiomycota* peuvent être uni- ou multicellulaires, terrestres ou aquatiques et sexués ou asexués (Hibbett et Binder, 2001).

Les *Glomeromycota* bien que moins connus que les *Dikarya*, commencent eux aussi à être considérés pour leurs effets bénéfiques sur les plantes. Environ 240 espèces sont d'ores et déjà décrites dans ce phylum qui fera l'objet des études présentées dans ce manuscrit.

3. Mode de vie des champignons

Les *Fungi* sont chimiohétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils puisent leur énergie à partir des molécules carbonées récupérées dans leur environnement puisqu'ils ne peuvent les produire. Ils possèdent différents modes de nutrition et donc différents mode de vie. Cette variété provient de leur ubiquité dans les écosystèmes aussi bien terrestres qu'aquatiques.

Certains champignons sont des parasites considérés comme pathogènes qui tirent parti d'autres organismes et peuvent engendrer des maladies allant parfois jusqu'à la mort de l'hôte. Ces parasites s'attaquent aussi bien aux plantes (comme par exemple la rouille noire provoquée par le *Basidiomycota* : *Puccinia graminis*), aux autres champignons (*Nyctalis asterophora* qui s'attaquent aux russules et lactaires), aux algues ou aux animaux (comme le champignon *Beauveria sp.* utilisé dans la lutte contre le paludisme puisque parasitant les moustiques) et aux Hommes (les aspergilloses sont engendrées par la présence d'un ascomycètes du genre *Aspergillus*). A l'extrême, il semblerait que certaines espèces de champignons soient décrites comme carnivores puisqu'elles capturent et digèrent leurs proies, souvent des nématodes (Kerry, 2000).

Certains champignons, comme ceux du genre *Malassezia*, sont considérés comme commensaux, c'est-à-dire qu'ils tirent profit de leur hôte sans lui nuire mais sans lui apporter d'avantage, bien qu'ils soient aussi considérés comme parasites opportunistes.

De nombreuses espèces de champignons sont saprotrophes, se nourrissant ainsi de la dégradation de la matière organique morte (bois, feuilles, cadavres). C'est le cas du champignon *Tricholomopsis ornata* qui dégrade les feuilles mortes. Tandis que des espèces saprophytes dégradent la cellulose ou l'hémicellulose (comme par exemple les pourritures marron cubiques), seules quelques espèces dégradent aussi la lignine (cas des pourritures blanches).

Enfin, le dernier mode de vie reporté chez les champignons est la symbiose définie comme une association durable avec un autre organisme. Les champignons mettent en place ce type d'interaction avec différents partenaires. Les lichens, par exemple, sont des associations symbiotiques entre champignons et des organismes photo-autotrophes comme les algues vertes et les cyanobactéries (Ahmadjian, 1993). Les champignons peuvent aussi former ce type de symbiose mutualiste avec les systèmes racinaires des plantes. Dans ce cas, la symbiose sera alors qualifiée de mycorhizienne et c'est cette dernière qui constitue le sujet des études présentées dans cette thèse.

B. Les différentes symbioses mycorhiziennes

La symbiose mycorhizienne est une association symbiotique mutualiste entre un champignon mycorhizogène (« myco » en grec) et une racine de plante hôte (« rhiza » en grec). Cette association symbiotique est prévalente puisque 80 % des plantes sont mycorhizées (Newman et Reddell, 1987). En effet, seules quelques familles de plantes ne forment pas de symbiose mycorhizienne telles que les *Chenopodiaceae*, les *Caryophyllaceae*, les *Brassicaceae*, ou les *Urticaceae*. Il existe sept types de symbioses mycorhiziennes dont les trois principales sont : l'ectomycorhize, l'ectendomycorhize et l'endomycorhize. Elles se distinguent les unes des autres non seulement

par les groupes taxonomiques des partenaires symbiotiques impliqués, qu'ils soient végétaux ou fongiques mais aussi par les structures typiques formées lorsque la symbiose est fonctionnelle (Figure 1.2).

La formation de symbiose ectomycorhizienne (du grec « ecto », extérieur) se fait principalement avec des plantes ligneuses, arbres et arbustes, les champignons sont alors qualifiés d'ectotrophes. Les plantes formant ce type de symbiose représentent environ 5 % des végétaux, majoritairement issues des familles végétales suivantes : *Pinaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Salicaceae* et *Myrtiaceae*. Ce type de mycorhize est retrouvé aussi bien dans les régions boréales que tempérées. Il se caractérise par la présence d'un feutrage mycélien continu sur la racine qui peut aller jusqu'à l'enrobement total de celle-ci, constituant un manchon fongique (aussi appelé manteau). Le partenaire fongique s'insère uniquement entre les cellules racinaires de la plante (inter-cellulaire). Le mycélium se propage à l'extérieur de la racine de deux façons : la première sert à l'exploration du compartiment sol et à l'absorption des nutriments dans celui-ci tandis que la deuxième forme par agglomération autour de la racine un manchon pseudo-parenchymateux, aussi appelé « manchon gainant ». Au sein de la racine, se développe ainsi un réseau d'hyphes au niveau des cellules du cortex de la racine, dit « réseau de Hartig » qui est le lieu des échanges nutritifs entre la plante et le champignon. Les champignons qui forment ce type de symbiose avec les plantes appartiennent soit aux *Basidiomycota* soit aux *Ascomycota*.

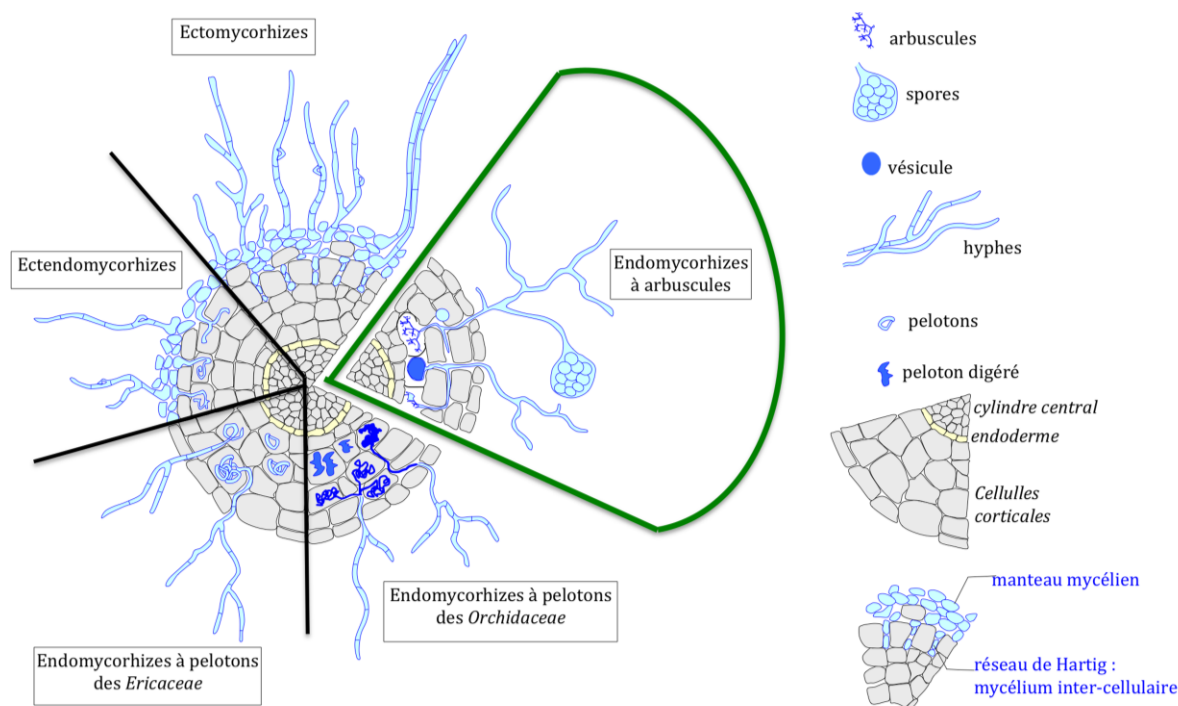


Figure 1.2: Les principales symbioses mycorhiziennes décrites et de leur structures inter et intra racinaires, à partir de Slosser et Le Tacon (1998), modifié du site : <http://www.plantes-botanique.org>.

Les ectendomycorhizes possèdent à la fois des structures typiques des ectomycorhizes et d'autres intracellulaires (« endo ») retrouvées chez les endomycorhizes. En effet, elles présentent aussi un « réseau de Hartig » ainsi qu'un manteau fongique enroulant la racine mais plus lâche et moins développé que chez les ectomycorhizes. De plus, des structures intracellulaires (caractéristiques des endomycorhizes, cf. ci-après) peuvent être aussi observées : les pelotons. Les champignons responsables de ce type de symbiose sont tous des

Ascomycètes principalement du genre *Wilcoxina*. Ce type de mycorhize n'est retrouvé que dans un nombre restreint de familles de plantes comme les *Pinus*, les *Picea* et les *Larix*.

La mycorhize arbutoïde ne se rencontre que chez certains genres de plantes des Ericales, elle est donc très restreinte et concerne uniquement les biomes de type forêt ou maquis. Les champignons responsables de ce type de mycorhize sont des *Basidiomycota* qui sont souvent aussi impliqués dans la formation d'ectomycorhizes. Les structures formées au cours des mycorhizes arbutoïdes sont donc proches de celles des ectomycorhizes car un réseau de Hartig est retrouvé bien qu'il se limite aux cellules proches de l'épiderme. De plus, les hyphes pénètrent les cellules des racines de la plante hôte formant des rouleaux au sein des ces dernières.

Chez les mycorhizes monotropoïdes, les hyphes forment un réseau de Hartig. Certaines hyphes de ce réseau croissent vers les cellules corticales entraînant une invagination de la paroi de ces cellules végétales qui épousent alors l'hyphe. Des protubérances dans les cellules corticales les plus externes se forment donc, permettant les transferts de nutriments. Ce type de symbiose n'est formé que par un nombre limité de *Basidiomycota* et d'*Ericaceae* : les *Monotropaceae*.

La mycorhize des orchidées aussi nommée mycorhize à pelotons présente, comme son nom l'indique, des pelotons intracellulaires formés par enroulement des hyphes sur eux-mêmes au sein de la cellule hôte. Ce type de symbiose mycorhizienne est restreint aux *Orchidaceae* et ne concerne que certains *Basidiomycota* anciennement regroupés dans le genre *Rhizoctonia*.

La mycorhize éricoïde est présente uniquement chez les Ericacées. La mycorhization se limite aux cellules épidermales des racines. Les champignons formant cette symbiose sont des *Ascomycota* du genre *Rhizoscyphus ericae* qui sont des symbiotes facultatifs ou des *Basidiomycota* du genre *Sebacina* (Selosse *et al.*, 2007) genre aussi connu pour former des symbioses ectomycorhiziennes (Selosse *et al.*, 2002) ou éricoïdes (Smith et Read, 2008).

Enfin, l'endomycorhize représente 95 % des associations mycorhiziennes. L'endomycorhize à arbuscules est la forme la plus répandue (Figure 1.2, encadré vert). Les partenaires fongiques de cette symbiose sont nommés les Champignons Mycorhiziens à Arbuscules : « CMA ». Les CMA constituent une part importante de la biomasse microbienne dans beaucoup d'écosystèmes terrestres (Miller *et al.*, 1995). Enfin, l'endomycorhize à arbuscules est une symbiose extrêmement ancienne. En effet, elle est datée de la même époque que l'apparition des plantes terrestres, il y a 460 millions d'années, durant l'Ordovicien (Berbee et Taylor, 1993; Redecker, 2000). Elle s'effectue entre un champignon mycorhizien à arbuscules (CMA) et plus de 80 % des plantes terrestres. Seules quelques familles de plantes ne forment pas ce type de symbiose, telles que les *Juncaceae*. C'est cette association mycorhizienne que j'ai étudiée durant cette thèse.

II. Les champignons mycorhiziens à arbuscules, CMA

A. Cycle de vie, structures et fonctions des CMA

1. Cycle de vie des CMA

Les CMA sont des biotrophes obligatoires c'est-à-dire qu'ils nécessitent un hôte capable de photosynthèse pour survivre et compléter leur cycle de vie. Celui-ci peut être divisé en trois étapes, à savoir l'établissement de la symbiose, la phase de croissance végétative et la phase de dissémination.

Le cycle de vie du CMA débute par la phase d'établissement de la symbiose, Figure 1.3. Elle se compose d'une étape de reconnaissance de l'hôte et d'un stade d'établissement proprement dit. La reconnaissance de l'hôte passe par l'activation des propagules contenues dans le sol. Ainsi, il y a germination spontanée d'une spore puis formation d'hyphes germinatifs. En absence de reconnaissance d'hôte, la germination peut ralentir voire cesser mais garde suffisamment de ressources carbonées afin de pouvoir répéter cette germination. Pour que l'établissement de la symbiose se fasse, il est nécessaire que les deux partenaires puissent communiquer dans le compartiment sol. La formation d'hyphes germinatifs est intensifiée via l'échange de signaux moléculaires. En réponse aux exsudats racinaires, composés notamment de strigolactones, sécrétés par une plante hôte (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1989; Besserer *et al.*, 2006), la morphologie des hyphes change et adopte une croissance ramifiée intense (Buée *et al.*, 2000). Ainsi, les hyphes germinatifs s'allongent-ils et forment, par ramification, un réseau mycélien pré-symbiotique se développant en direction de la racine. De plus, le CMA relâche alors dans le sol des facteurs « Myc » qui vont entraîner, chez la plante, l'activation de la voie de signalisation de la symbiose (Delaux *et al.*, 2013) et de ce fait plus de racines latérales sont mises en place (Olah *et al.*, 2005; Genre *et al.*, 2013). Au contact de la racine, le CMA forme un appressorium : structure bien différenciée et spécialisée dans la reconnaissance entre les deux partenaires. Celui-ci constitue le siège de la pénétration du champignon dans la racine.

C'est alors que commence la phase d'établissement de la symbiose pendant laquelle le champignon se développe de façon intraradiculaire via la formation d'hyphes intercellulaires. Une fois au niveau des cellules corticales, de nouvelles structures caractéristiques et très ramifiées se forment au sein des cellules : les arbuscules. L'arbuscule qui donne son nom à ce type de symbiose, est le site d'échange nutritif entre les deux partenaires. Son établissement entraîne de nombreuses modifications morphologiques de la cellule sans endommager son intégrité. La symbiose est alors en place.

Le cycle du CMA se poursuit par la phase végétative durant laquelle le mycélium se développe de façon intensive extraradiculairement (à l'extérieur de la racine). Certains CMA façonnent aussi des structures de réserves intraradiculaires, les vésicules, qui peuvent être intra- ou intercellulaires. Durant cette phase, la biomasse du champignon augmente car il crée un réseau mycélien d'exploration dans du sol, à partir duquel il peut aussi coloniser d'autres plantes. Enfin, le cycle de vie se boucle par le stade de reproduction, qui chez les CMA est aussi appelée « sporulation », consistant en la mise en place de propagules, principalement des spores.

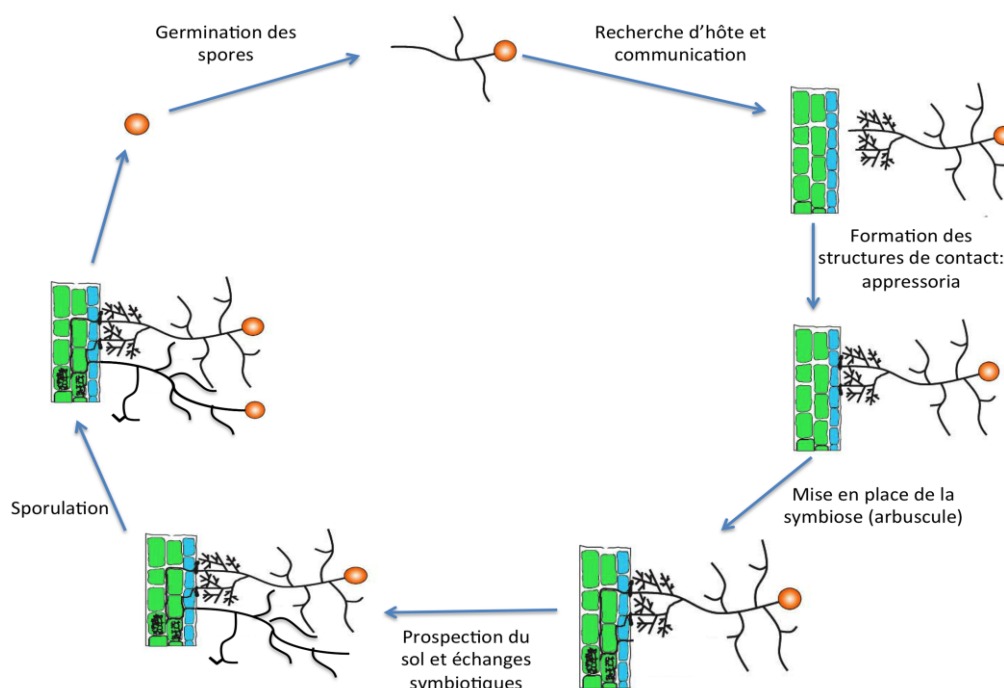


Figure 1.3 : Schéma du cycle de vie d'un CMA, adapté de Besserer (2008).

2. Structures et fonctions des CMA

Au cours de leur cycle de vie, les CMA forment donc des structures différentes : des spores, des hyphes, des arbuscules et parfois des vésicules ou des cellules auxiliaires. Ces structures possèdent chacune une fonction plus ou moins propre.

Les spores sont des organes de réserves et de dissémination. Elles peuvent être produites en nombre variable, selon les espèces de CMA et l'espèce de plantes par exemple (Hetrick et Bloom, 1986). Les spores constituent la principale structure anatomique qui sert à la détermination morphologique des espèces de CMA. La taille de ces spores est fluctuante et ce même au sein d'une espèce. Par exemple, chez l'espèce *Rhizophagus irregularis*, les spores peuvent avoir une taille allant de 30 μm à 130 μm (Koffi *et al.*, 2009). Les spores sont formées soit à la surface du sol soit au sein des racines des plantes, comme c'est le cas pour la plupart des espèces du genre *Rhizophagus*. De plus, certaines espèces de CMA produisent des sporocarpes (Redecker *et al.*, 2007) telles que l'espèce *Redeckera fulva*. Les spores sont poly-nucléées et le nombre de noyaux est variable selon l'espèce, par exemple, chez l'espèce *Scutellospora castanea*, il en a été dénombré jusqu'à 700 (Hosny *et al.*, 1998) et chez *Gigaspora margarita* jusqu'à 2000 (Bécard et Pfeffer, 1993). A l'heure actuelle, aucune reproduction sexuée chez les CMA n'a pu être prouvée, par conséquent les spores sont considérées comme asexuées. Ces spores peuvent rester en dormance durant de longues périodes (Smith et Read, 2008) et leur viabilité change en fonction des conditions extérieures.

Les vésicules qui sont aussi des structures de réserves, possèdent une paroi épaisse et contiennent des lipides. Les vésicules sont observées aussi bien entre les cellules racinaires des plantes qu'au sein de ces dernières. Elles ne sont pas présentes chez tous les CMA, c'est le cas des *Paraglomeraceae* et des *Gigasporaceae* notamment, c'est la raison pour laquelle le nom de « champignons mycorhiziens à arbuscules et vésicules » n'est plus usité. De

la même façon que les spores, les vésicules présentent des formes diverses selon les espèces (Jabaji-Hare *et al.*, 1984) et plusieurs noyaux qui font d'elles aussi des propagules (Biermann et Linderman, 1983; Declerck *et al.*, 1998).

Chez les espèces de la famille des *Gigasporaceae*, des cellules auxiliaires à l'extrémité des hyphes extraradiculaires ont été trouvées (Jabaji-Hare *et al.*, 1986). Ces structures, métaboliquement actives, sont riches en noyaux, organelles et lipides (Bonfante *et al.*, 1994) mais leur rôle est méconnu. En effet, aucune preuve ne confirme que ces structures se substituent aux vésicules (Bonfante *et al.*, 1994) et il semblerait que ce ne soit pas des propagules (Biermann et Linderman, 1983). Comme leur nombre augmente avant la sporulation et diminue après, il est supposé qu'elles fournissent des éléments carbonés favorisant la formation des spores.

L'arbuscule, comme dit précédemment en forme de petit arbre, est la principal site d'échange entre la plante hôte et son symbiote (Gianinazzi *et al.*, 1983). L'arbuscule est intracellulaire mais pas intra-cytoplasmique puisqu'il se met en place entre la membrane plasmique et la paroi de la cellule végétale sans altérer l'intégrité de cette dernière. Cette structure, reliée aux hyphes, est donc un indicateur de l'activité symbiotique. La forme exacte des arbuscules varie selon le genre du CMA (Smith et Read, 2008).

D'un point de vue morphologique, les hyphes des CMA sont coenocytiques, à savoir non septés, la plupart des noyaux bougent ainsi librement dans les hyphes bien que certains situés en position latérale semblent immobiles (Bago *et al.*, 1999). Les hyphes intraradiculaires sont reliés aux arbuscules et se prolongent de façon extraradiculaire dans le sol. Elles se propagent dans le sol créant ainsi un réseau mycélien qui peut atteindre des longueurs importantes allant jusqu'à plusieurs dizaines de mètres par gramme de sol (Leake *et al.*, 2004). La capacité des différents CMA à former ces réseaux mycéliens peut différer (Voets *et al.*, 2006). Les CMA étant des biotrophes obligatoires, l'exploration du sol par le réseau mycélien participe à la survie du champignon car cela leur permet de rencontrer d'autres plantes hôtes. De plus, le réseau mycélien absorbe les éléments nutritifs du sol (azote, phosphore notamment) agissant comme une extension du système racinaire des plantes dans le sol (Newman et Reddell, 1987), fonction *sine qua non* au statut symbiotique des CMA.

B. Taxonomie et phylogénie des CMA

1. Evolution de la taxonomie et de la phylogénie des CMA

Selon l'historique approfondi de la taxonomie et de la systématique des *Glomeromycota* (Stürmer, 2012), l'évolution de taxonomie et la phylogénie des CMA peut se décrire en quatre phases. La première est une période descriptive (1845 à 1974), la seconde est basée sur la morphologie (1975-1989). La troisième est cladistique, à savoir fondée sur la mise en place d'outils moléculaires alliés aux méthodes morphologiques (1990-2000). Enfin, la quatrième est phylogénétique (2001-actuel) car s'appuyant uniquement sur des techniques moléculaires et informatiques.

Ainsi, les premières descriptions d'espèces de *Glomeromycota* (*Glomus microcarpum* et *Glomus macrocarpum*) ont-elles eu lieu en 1845 (Tulasne et Tulasne, 1845). En 1922, les CMA étaient placés au sein des *Endogonaceae* (Thaxter, 1922) et des Zygomycètes. Au fil des années, le nombre d'espèces et de genres décrits a

augmenté (Gerdemann et Trappe, 1974). C'est en 1990 (Morton et Benny, 1990) que les CMA sont distingués des *Endogonales* et mis dans l'ordre des *Glomales*. Les espèces de *Glomales* sont alors caractérisées comme établissant toutes des relations symbiotiques mutualistes à bénéfices réciproques (Morton, 1990). A cette époque, l'identification des espèces se fondait sur la morphologie des spores et en particulier sur celle de leurs parois (Morton, 1988). Mais, comme certaines espèces présentent plusieurs morphotypes de spores, l'identification des espèces sur la base de variations morphologiques s'est avérée difficile (Sanders *et al.*, 1995). Des techniques moléculaires ont alors été développées pour pallier aux critères morphologiques comme celles faisant appel aux profils lipidiques (Bentivenga et Morton, 1994) ou à l'ADN nucléaire (Simon *et al.*, 1993). Cependant, ce sont ces outils moléculaires basés sur l'ADN qui seront les plus utilisés par la suite. En effet, ces méthodes, fondées sur l'amplification de l'ADN des CMA par polymérisation en chaîne (PCR) permettent non seulement une identification de ces derniers à plus ou moins haute résolution mais aussi l'étude des relations phylogénétiques qui existent entre les CMA (Simon *et al.*, 1992; Sanders *et al.*, 1995; Redecker *et al.*, 1997).

Le développement des techniques moléculaires et la concordance des résultats avec les caractéristiques morphologiques ont fait évoluer la phylogénie (Morton et Redecker, 2001a) aboutissant au regroupement des CMA dans le phylum des *Glomeromycota* (Schüßler *et al.*, 2001; Schwarzott *et al.*, 2001). Grâce à ces techniques, il est aujourd'hui prouvé que des spores ayant des morphologies similaires peuvent être produites par des champignons qui sont phylogénétiquement distants (Walker *et al.*, 2007). Après de nombreux changements de la classification des *Glomeromycota* ces dernières années (Oehl *et al.*, 2008; Morton et Msiska, 2010; Schüßler et Walker, 2010; Oehl *et al.*, 2011a; Oehl *et al.*, 2011b; Oehl *et al.*, 2011c), la classification la plus récente prend en compte les aspects de phylogénie moléculaire et de morphologie (Redecker *et al.*, 2013). Cette dernière est employée durant cette thèse.

2. Taxonomie et phylogénie actuelle

Le phylum des *Glomeromycota* fait mention d'environ 240 espèces décrites à ce jour, réparties en quatre ordres, onze familles et vingt-cinq genres (Redecker *et al.*, 2013, Figure 1.4). Avec cette classification, une grande partie des noms scientifiques des espèces a été revue.

L'ordre des *Paraglomerales* (Schüßler *et al.*, 2001) compte une famille comprenant un seul genre : *Paraglomus* (Morton et Redecker, 2001b). Ce genre serait le clade qui a divergé en premier selon les études phylogénétiques basées sur l'ADN ribosomal (Redecker et Raab, 2006). Les trois espèces de référence décrites à ce jour forment des spores de petites tailles.

L'ordre des *Archaeosporales* (Walker *et al.*, 2007) comprend trois familles, incluant chacune un seul genre qui sont nommés : *Archaeospora*, *Ambispora* et *Geosiphon*. Au total, cet ordre présente environ une dizaine d'espèces décrites.

Les deux ordres les plus fournis en espèces décrites sont les *Diversisporales* et des *Glomerales*.

L'ordre des *Diversisporales* (Walker et Schüßler, 2004) est peut être le plus complexe puisqu'il regroupe cinq familles différentes. Trois d'entre elles, *Acaulosporaceae*, *Pacisporaceae* et « *Sacculosporaceae* », ne contiennent qu'un genre chacune tandis que les deux familles restantes, *Diversisporaceae* et *Gigasporaceae*, en

présentent un nombre incertain, comme le montre les astérisques de la Figure 1.4. Parmi les cinq genres de la famille des *Diversisporaceae*, seuls deux s'appuient sur des données moléculaires : les *Redeckera* comptant environ

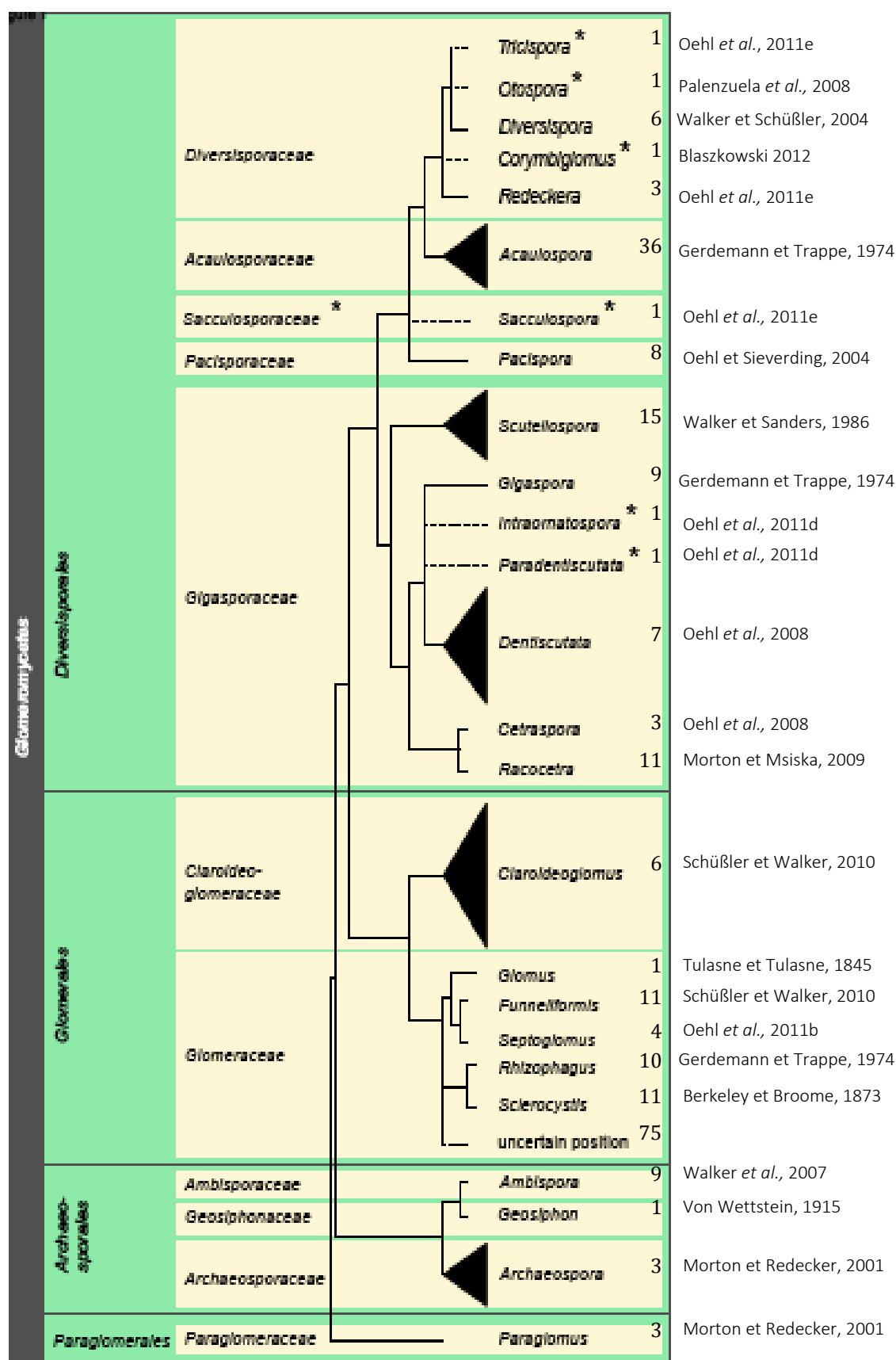


Figure 1.4 : Phylogénie actuelle des *Glomeromycota*, tirée de (Redecker *et al.*, 2013). Les traits pointillés indiquent une position phylogénétique incertaine. Les astérisques, quant à eux, soulignent les genres pour lesquels il manque des données mais qui n'ont pas été remaniés. Le nombre d'espèces décrites par genre ainsi que les auteurs ayant décrit ces genres pour la première fois sont indiqués à droite.

trois espèces et les *Diversispora* environ une dizaine. La famille des *Gigasporaceae*, quant à elle, est composée de sept genres totalisant 35 espèces. Outre, les deux genres qui ont une position incertaine (lignes pointillées dans la Figure 1.4), les cinq autres se nomment: les *Scutellospora*, les *Gigaspora*, les *Dentiscutata*, les *Cetraspora* et les *Racocetra*.

L'ordre des *Glomerales* (Morton et Benny, 1990) comprend deux familles, les *Claroideoglomeraceae* et les *Glomeraceae*. La première présente un seul genre qui correspond à environ six espèces ; tandis que la deuxième famille comporte une centaine d'espèces réparties en au moins six genres. Ces deux familles ont longtemps été confondues au sein des *Glomeraceae* puisque ce n'est que récemment que les *Claroideoglomeraceae* ont été séparés des *Glomeraceae* (Schüßler et Walker, 2010).

C. Aspects génétiques chez les CMA

1. Génétique des CMA

Comme aucune preuve de reproduction sexuée n'a été trouvée (Sanders, 1999), même chez les fossiles de CMA, il a été suggéré que les CMA sont asexués et sont donc un des plus anciens groupes d'organismes se reproduisant de façon clonale (den Bakker *et al.*, 2010). Il a été trouvé un grand polymorphisme dans les séquences de gène codant pour l'ARN ribosomal (Sanders *et al.*, 1995). Puisque les espèces supposément asexuées ont une tendance à avoir une grande variation individuelle de leur ARN ribosomal (*e.g.* Pawlowska, 2005), il n'a pas été étonnant de retrouver un fort polymorphisme des ARN ribosomaux chez les espèces de CMA. Pour expliquer cette variabilité, deux hypothèses ont été proposées : l'hétérocaryose et l'homocaryose (Pawlowska et Taylor, 2004; Hijri et Sanders, 2005). L'hétérocaryose suppose que les noyaux arborent des formes différentes d'un même locus. L'homocaryose peut être due soit à la présence de noyaux haploïdes ce qui sous-tend qu'au sein d'un noyau, il peut y avoir plusieurs variations d'un locus ; soit à des noyaux polyploïdes avec des formes différentes réparties sur plusieurs chromosomes. De surcroît, des recombinaisons para-sexuelles ont été suggérées chez les CMA (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001). D'autres études ont montré l'existence de fusions hyphales, nommées « anastomoses ». Ces anastomoses ont été décrites comme se faisant entre hyphes extra-radicaux d'un même isolat comme chez les espèces *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis caledonium* et *Rhizophagus irregularis* et conduisent à des échanges de noyaux et de cytoplasmes (Giovannetti *et al.*, 1999; Giovannetti *et al.*, 2001; Giovannetti *et al.*, 2003). Ce phénomène d'anastomose a aussi été rapporté chez certaines espèces de la famille des *Gigasporaceae* (de la Providencia *et al.*, 2005). La présence de ce processus participerait à la conservation de la diversité génétique chez les CMA même au niveau populationnel chez l'espèce *Rhizophagus irregularis* (Croll *et al.*, 2008; Cardenas-Flores *et al.*, 2010). Cependant, aucune fusion entre isolats géographiquement et génétiquement distants n'a été observée, comme chez les espèces *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus irregularis* (Giovannetti *et al.*, 2003; Cardenas-Flores *et al.*, 2010). De plus, la présence de phénomène d'anastomose n'a pas été montré dans les hyphes intra-radicaux (Purin et Morton, 2013). Enfin, il n'est pas avéré que ces anastomoses aient lieu dans tous les genres de CMA (Purin et Morton, 2011). Ainsi, a-t-il été suggéré qu'il existait un processus de reconnaissance entre hyphes, semblable à ceux des autres *Fungi*, à savoir une incompatibilité végétative (Pawlowska et Taylor, 2004).

Grâce au séquençage du génome du premier des glomeromycètes de la famille des *Glomeraceae*: *Rhizophagus irregularis*, souche DAOM197198, initié en 2004, un premier aperçu de l'organisation globale de son génome nucléaire a pu être donné estimant sa taille entre 14 et 16,5 Mb par noyau (Hijri et Sanders, 2004). Mais l'assemblage du génome a présenté des difficultés (Martin *et al.*, 2008). Puis une étude par cytométrie de flux a révisé cette estimation à 154 Mb plus ou moins 6 Mb. La première version entièrement annotée n'a été publiée que récemment (Tisserant *et al.*, 2013) révélant finalement que la taille du génome est de 150 Mb. En parallèle, un autre séquençage par isolation de noyaux de la même espèce a été effectué (Lin *et al.*, 2014). Ces deux études convergent vers la même conclusion, à savoir que les noyaux des spores des CMA sont haploïdes et homocaryotiques contrairement à ce qui avait été proposé auparavant (Kuhn *et al.*, 2001; Hijri et Sanders, 2005). De par son génome séquencé, l'espèce *Rhizophagus irregularis* constitue un modèle d'étude de choix, d'autant plus que son génome mitochondrial (isolat 454) est entièrement séquencé depuis 2009 (Lee et Young, 2009). Cette espèce autrefois confondue avec *Glomus intraradices* (Stockinger *et al.*, 2009) puis nommée *Glomus irregulare* (Blaskowski *et al.*, 2008), est largement utilisée en tant qu'inoculum car elle est facilement cultivable en pot. Ce champignon qualifié d'ubiquiste est présent dans des habitats très variés tels que les prairies alpines (Sýkorová *et al.*, 2007b), les prairies calcaires (Sýkorová *et al.*, 2007a), les champs arables (Hijri *et al.*, 2006), les sites géothermaux (Appoloni *et al.*, 2008) ou encore les sites pollués en phosphate (Renker *et al.*, 2005). Sur la base des échanges de noyaux observés entre isolats de *Rhizophagus irregularis* (Croll et Sanders, 2009; Cardenas-Flores *et al.*, 2010) et l'apparente homogénéité soulignée de son génome mitochondrial, il semblerait que la phase plasmogamique ne soit que transitoire (Young, 2009; de la Providencia *et al.*, 2013). Afin d'expliquer le maintien d'unicité des séquences mitochondriales chez les CMA, deux scénarii ont été proposés (Lee et Young, 2009) : d'une part une ségrégation génétique des mitochondries par goulet d'étranglement ; d'autre part, un mécanisme de ségrégation actif où seuls les mitochondries dont l'ADN est identique, seraient transmises à la descendance.

2. Notions imbriquées : communauté, espèce, population et individu

Notion de communauté

En écologie, une communauté est définie comme un assemblage de populations d'espèces différentes vivant au sein d'un même habitat. Au sein de cet habitat, de nombreux types d'interactions biotiques peuvent apparaître, comme expliqué précédemment, sans parler de celles qui surviennent entre CMA et plantes. Il y aura donc des interactions entre espèces de CMA et d'autres microorganismes tels que les champignons ou les bactéries. Au sein de la communauté de CMA peuvent aussi s'établir des interactions entre espèces de CMA, entre populations de différentes espèces ou entre populations de la même espèce. Toutes ces interactions, qu'elles soient symbiotiques, de compétitions, parasitaires ou autres, rendent l'étude des communautés très complexe dans son ensemble.

Les analyses des communautés de CMA dans les écosystèmes naturels et cultivés s'intéressent non seulement à la composition de la communauté en espèces de CMA mais aussi à leurs quantités relatives au sein de la communauté et parfois aux relations phylogénétiques qui existent entre elles. Ainsi, des indices de diversité, de richesse spécifique sont-ils calculés et des espèces indicatrices parfois identifiées. Ces études se focalisent donc toutes sur la notion d'espèce qui est difficile à appréhender chez les CMA.

Notion d'espèce

Sur la base du concept d'espèce biologique, deux organismes sont de la même espèce s'ils peuvent produire une descendance fertile (Mayr, 1942). Or, cette définition ne peut s'appliquer aux organismes asexués (Ghiselin, 1987). Ainsi, d'autres concepts de la notion d'espèce ont-ils vu le jour notamment ceux des concepts d'espèce morphologique, d'espèce écologique, phénétique, évolutionariste, phylogénétique (c.f. de Quieroz, 2007). La délimitation d'espèce chez les champignons est aussi complexe (Taylor *et al.*, 2000) et l'importance de l'utilisation des principes généraux dans la définition des espèces chez les CMA ont été récemment soulignés (Redecker *et al.*, 2013). La reconnaissance d'espèce sur le plan moléculaire n'est pas consensuelle étant donné que les séquences qui sont obtenues par ces méthodes sont ensuite comparées à des bases de données de référence. Ainsi, des concepts bio-informatiques ont-ils vu le jour notamment celui de « l'Unité Taxonomique Opérationnelle » (OTU), synonyme de « l'Unité Taxonomique Moléculaire Opérationnelle » (MOTUs) qui constitue un regroupement de séquences de très hautes similarités. C'est par assignation phylogénétique de ces séquences à des espèces précédemment identifiées et par regroupement de ces OTUs selon cette assignation que sont déterminés les « Taxons Moléculaires » (MTs) aux niveaux de l'espèce du genre ou de la famille.

Notion de populations

Une population peut être définie en écologie comme un groupe d'organismes ou d'individus de la même espèce qui occupent un même espace particulier à un moment donné et qui peuvent donc interagir entre eux (Waples et Gaggiotti, 2006). Alors que l'étude des communautés et donc des espèces de CMA peut se faire aussi par la morphologie des spores, celle des populations ne s'effectue qu'à partir de données moléculaires. Par conséquent, chez les CMA, la notion de population peut correspondre à la présence de groupes d'isolats dans un habitat donné ou un écosystème donné, ce qui en terme de données moléculaires revient à des regroupements de séquences ne variant que très faiblement les unes par rapport aux autres. Au vu du nombre d'espèces de CMA, peu d'informations sont actuellement connues sur la structuration des populations intraspécifiques de CMA. Ainsi, des études sur l'espèce ubiquiste *Rhizophagus irregularis* ont montré une structuration populationnelle écotypique avec la présence d'une population retrouvée dans les prairies et d'une autre inféodée aux champs arables (Börstler *et al.*, 2010).

Notion d'individu

Au delà des notions de communauté, d'espèce et de population, existe la notion d'individu qui, chez les CMA, se rapporte à la notion d'isolat ou de souche. Les isolats seront considérés dans le reste de ce manuscrit comme issus d'échantillons environnementaux à partir desquels des spores, assimilés à des individus, ont été isolés et mis en « culture pure ». Une « culture pure » sous-entend qu'une seule spore isolée de l'environnement a été mise au contact d'une plante hôte (car ce sont des biotrophes obligatoires) et croît en absence d'autre CMA. Il existe ainsi des cultures pures de différents isolats qui sont conservées dans ce qui est appelé des collections de cultures. Plusieurs collections de cultures sont présentes à travers le monde, citons pour exemple l'INVAM (Collection de cultures internationale des champignons mycorhizien à arbuscules (<http://invam.wvu.edu/>)) de l'Université de West Virginia aux Etats-Unis d'Amérique et la BEG/IBG (Banque internationale des *Glomeromycota* (<http://www.i-beg.eu/>) située à Dijon. De par leur statut de biotrophes obligatoires, ces champignons sont

difficilement cultivables en conditions axéniques, c'est à dire en absence d'autres organismes. Ainsi, Fortin *et al.*, (2002) ont discuté les progrès et les limites en matière de recherche sur la mise en place de culture *in vitro* à partir d'une spore isolée rendant ce type de culture complexe.

D'un point de vue moléculaire, le séquençage des isolats a conduit à l'obtention de séquences de référence. Ces dernières, en fonction du marqueur, peuvent être homogènes ou hétérogènes. C'est pourquoi, le terme « haplotype » (souvent assimilé au génotype car c'est la contraction de génotype haploïde) est alors utilisé. Un haplotype correspond donc ici, comme le terme « génotype », à des séquences similaires. Ainsi, une étude (Rosendahl *et al.*, 2009) a reporté que l'haplotype prédominant chez l'espèce *Funneliformis mosseae* différait entre champs cultivés et jachères suggérant un rôle du type d'usage de sol sur la structuration des populations de cette espèce. Chez l'espèce *Rhizophagus irregularis*, des populations d'haplotypes ont été différenciés à ce jour : une préférentiellement inféodée aux prairies (14 haplotypes) et une autre préférentiellement retrouvée dans les champs arables (13 haplotypes ; Börstler *et al.*, 2010).

III. Place des CMA dans l'écosystème

A. Influence des CMA sur l'écosystème

Les CMA jouent un rôle important dans les écosystèmes, que ces derniers soient naturels ou cultivés, puisqu'un grand nombre de services rendus aux écosystèmes leur sont attribués (Gianinazzi *et al.*, 2010). La multitude des services bénéfiques directs et indirects qu'ils rendent peut être classée en deux catégories : un rôle nutritif et un rôle protecteur.

1. Rôle nutritif des CMA vis à vis des plantes

Les écosystèmes naturels ou cultivés sont caractérisés par une limitation des nutriments dans le sol, notamment en azote et en phosphore (Smith et Read, 2008). Les CMA ont un rôle nutritif vis à vis des plantes dans ces milieux. En effet, une fois la symbiose mise en place, la plante, agissant comme une source, fournit des produits carbonés issus de la photosynthèse au symbiote, agissant comme un puits (Bago *et al.*, 2003). Ce dernier les transfère alors vers les parties en croissance de son organisme, tels que le mycélium extraradriculaire ou les spores en formation. La plante alloue ainsi entre quatre et 30 % de sa production carbonée au champignon (Hogberg et Hogberg, 2002; Smith et Read, 2008). En contrepartie, la plante a un accès indirect à un plus grand volume de sol via le réseau mycélien du CMA, comme une extension des racines de la plante. En effet, le CMA transmet aux arbuscules les nutriments du sol qu'il puise via son réseau mycélien, notamment l'azote et le phosphore qui sont les deux éléments principaux composant les engrais actuellement utilisés en agriculture.

Apport en Azote

Ainsi, le champignon joue-t-il un rôle important dans la nutrition azotée des plantes (Smith *et al.*, 2010). Alors que les plantes absorbent préférentiellement l'azote du sol sous la forme de nitrate (NO_3^-) et plus faiblement sous forme d'ammonium (NH_4^+), c'est sous sa forme inorganique, NH_4^+ , que l'azote est préférentiellement puisé du

sol par le CMA. Ce phénomène serait partiellement expliqué par le coût énergétique important pour la transformation de nitrate en ammonium par le CMA (cf. Marzluf, 1997 dans Casieri *et al.*, 2013). Ainsi, des transporteurs d'ammonium ont-ils été mis en évidence et caractérisés chez l'espèce *Rhizophagus irregularis* (Lopez-Pedrosa *et al.*, 2006). D'autre part, la dégradation de la matière organique du sol par le champignon peut aboutir à trois pourcent des ressources d'azote nécessaire à la plante hôte (Hodge *et al.*, 2010). De plus, des gènes de plantes codant pour des transporteurs de différentes formes d'azote, ou les transporteurs eux-mêmes, ont été identifiés comme plus actifs lors de la symbiose mycorhizienne à arbuscules (Hauser *et al.*, 2001; Hohnjec *et al.*, 2005). La diversité de ces mécanismes souligne l'importance de l'échange d'azote au cours de cette symbiose.

Apport en phosphore

Le phosphore est aussi un nutriment clé de la symbiose. En effet, autour de la racine, le phosphore inorganique (PO_4^-) présent dans le sol est souvent complexé, formant ainsi une zone très pauvre en phosphore disponible. La symbiose permet ainsi un apport de phosphore inorganique par le biais d'un transfert unidirectionnel du réseau mycélien vers la plante (Francis *et al.*, 1986). Les apports de phosphore vers la plante peuvent fluctuer de 20 à 100 %, en fonction des espèces végétales et fongiques et ce, indépendamment de l'effet du champignon sur la biomasse végétale (Smith *et al.*, 2004; Faceli *et al.*, 2010). D'ailleurs, plusieurs transporteurs de phosphore inorganique chez les plantes, appartenant à la famille des *Pth1*, ont été identifiés comme étant induits par la symbiose avec des CMA (Javot *et al.*, 2007a). De plus, il a été montré que cet élément joue un rôle de signalisation durant la symbiose (Javot *et al.*, 2007b).

Autres apports

D'autres éléments tels que le magnésium, le calcium, potassium, le cuivre (Li *et al.*, 1991), le soufre (Casieri *et al.*, 2013), le zinc ou encore le fer, sont mieux assimilés par la plante grâce au champignon (Smith et Read, 2008). Cependant, les mécanismes d'absorption par les CMA restent méconnus bien que leurs transferts vers la plante aient été prouvés, comme c'est le cas du potassium (Marschner et Dell, 1994) qui peut faire l'objet de dix pourcent des apports de la plante (Li *et al.*, 1991).

La symbiose mycorhizienne à arbuscules apparait comme un facteur qui influence positivement l'agrégation du sol (Bethlenfalvay *et al.*, 1999). En effet, par le mucilage excrété des hyphes et les exsudats racinaires, les deux partenaires favorisent la formation d'agrégats en liant et imbriquant les particules les unes aux autres (Rillig, 2004; van der Heijden *et al.*, 2006). Schreiner *et al.* (1997) affirment même que, dans des conditions expérimentales, les hyphes des CMA ont un rôle plus important dans la stabilisation des agrégats du sol que d'autres facteurs tels que la longueur racinaire ou les populations bactériennes. Ainsi, un sol bien structuré constitue-t-il un meilleur réservoir hydrique et minéral plus propice au développement de la plante. Par ailleurs, de par leur rôle dans la structuration du sol, les CMA contribuent aussi à l'apport en eau des plantes. Il semblerait que les CMA jouent un rôle direct dans l'acquisition de l'eau chez les plantes puisque des gènes codant pour des aquaporines, protéines membranaires des cellules formant des canaux perméables aux molécules d'eau, ont été récemment détectés dans le génome de l'espèce fongique *Rhizophagus irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013). De plus, il a été prouvé que l'expression de gènes de certaines aquaporines de plantes est modifiée lorsque la symbiose mycorhizienne à arbuscules est en place (Krajinski *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013).

Il a même été montré que de façon indirecte, de par tous ces apports, les CMA peuvent favoriser la croissance, la productivité et la pollinisation des plantes (Wolfe *et al.*, 2005).

2. Rôle protecteur des CMA vis à vis des plantes

Au delà de son rôle nutritif, les CMA ont aussi un rôle de protection vis à vis des plantes et de leur diversité qui peut être direct ou indirect. Alors que le rôle de protection direct des CMA sur les plantes ne se fait que par la présence du réseau mycélien faisant office de barrière physique contre les micro-organismes pathogènes, le rôle de protection indirect est plus vaste. En effet, ce rôle indirect passe par l'augmentation des défenses des plantes ou par l'augmentation de leurs tolérances face aux attaques pathogènes et autres stress. Aussi, la production de molécules antibiotiques qui protègent ainsi la plante contre les attaques pathogènes a-t-elle été démontrée (Azcón-Aguilar et Barea, 1996). De plus, cette interaction symbiotique permet à la plante d'augmenter ses défenses vis à vis de stress édaphiques et hydriques (Auge, 2001). Une étude a montré (Kula *et al.*, 2005) que, bien que les plantes mycorhizées soient plus sujettes à l'herbivorie que celles non mycorhizées, les CMA augmentent la tolérance de leur plante hôte à l'herbivorie en induisant une réponse compensatoire. Cette symbiose engendre aussi une plus grande tolérance à la toxicité métallique et au faible pH (Dueck *et al.*, 1986; Leyval *et al.*, 1997; Schützendübel et Polle, 2002). De ce fait, les CMA ont souvent été proposées comme agents intermédiaires importants dans la remédiation des sites pollués (Tullio *et al.*, 2003; Gaur et Adholeya, 2004; Weiss et Cozzarelli, 2008; Hassan *et al.* 2011). Or, différents isolats de CMA ont été montrés comme affectant différemment l'absorption des métaux lourds par les plantes (Leyval *et al.*, 1997). C'est pourquoi, les études actuelles se portent de plus en plus sur les communautés de plantes et de champignons trouvées dans ces zones polluées (Turnau *et al.*, 2001).

En plus de ces rôles protecteurs face aux attaques et aux stress, les CMA jouent aussi un rôle protecteur entre plantes. En effet, les CMA peuvent avoir un rôle important dans la sauvegarde de la diversité des plantes puisqu'il a été prouvé que la diversité de la communauté des CMA et l'identité des espèces qui la compose peuvent augmenter la structure et le fonctionnement des communautés végétales en présence (van der Heijden *et al.*, 1998). Grâce à l'étendue du réseau mycélien du CMA et à sa non préférence d'hôte, le CMA peut coloniser au même moment des plantes d'espèces différentes et ainsi les interconnecter, leur permettant alors d'échanger des signaux. Ainsi, il a été suggéré que les CMA peuvent protéger les jeunes plantules des effets allélopathiques, c'est-à-dire des effets de compétition entre plantes (Renne *et al.*, 2004).

Cependant, s'il est avéré que les CMA influencent grandement l'environnement dans lequel ils évoluent, notamment leur hôte, la réciproque est aussi vraie. Ainsi, l'écosystème et son fonctionnement ont une emprise sur les CMA.

B. Influence des facteurs écologiques sur les CMA

Les rôles bénéfiques des CMA dans la nutrition des plantes ou encore dans la protection contre certains pathogènes (Azcón-Aguilar et Barea, 1996) font qu'un intérêt particulier leur est porté en agriculture durable

puisqu'ils agiraient comme des bio-fertilisants (Hijri *et al.*, 2006). Afin de pouvoir utiliser ces services écosystémiques par le développement d'outils efficaces assurant le maintien des CMA au champ, il a été signalé comme essentiel d'identifier les facteurs influençant la communauté de CMA et particulièrement de comprendre l'impact des pratiques culturales (Douds et Millner, 1999).

1. Rôle des pratiques culturales sur les CMA

Alors que les pratiques culturales sont généralement rapportées comme étant délétères sur les communautés de CMA (Helgason *et al.*, 1998; Oehl *et al.*, 2003; Oehl *et al.*, 2004; Oehl *et al.*, 2005; Gosling *et al.*, 2006) certaines études ont montré que les sols cultivés n'ont pas forcément une faible diversité de CMA, ce qui souligne l'importance de la prise en compte des pratiques culturales appliquées et du type de sol des parcelles concernées (Hijri *et al.*, 2006). Les pratiques culturales actuelles ciblées sont le retournement du sol, la fertilisation, la monoculture ou encore l'apport de fongicide (Schreiner et Bethlenfalvay, 1997).

Impact du travail du sol

Le travail du sol se fait classiquement par labour. Il consiste en un retournement des horizons supérieurs du sol allant jusqu'à environ 30 cm de profondeur. Cette pratique a comme avantages : la répression des adventices, le nivellement et l'aération du sol ou encore l'incorporation des engrais. Cependant, ce retournement a aussi pour conséquence une destruction mécanique quasi totale des réseaux mycéliens mis en place jusqu'au labour (Jasper *et al.*, 1989; Evans et Miller, 1990; McGonigle *et al.*, 1990). Lors de ce retournement, les propagules des *Glomeromycota*, et principalement les spores, sont enfouies plus profondément dans le sol (Abbott et Robson, 1991). De plus, la colonisation des plantes s'effectue plus tardivement puisque le cycle du CMA doit être repris depuis son stade initial, ce qui affecte la nutrition des plantes et de ce fait leur croissance pour un temps donné. Plusieurs études ont montré que le labour entraîne des changements dans la structure des communautés de CMA (Jansa *et al.*, 2002a; Jansa *et al.*, 2003). En effet, en fonction de leurs stratégies d'histoire de vie et notamment de leur capacité à coloniser plus ou moins rapidement les racines des plantes, ces changements peuvent être caractérisés par l'augmentation ou la disparition de certains groupes de CMA (Abbott *et al.*, 1992; Klironomos et Hert, 2002). Ainsi, les familles d'*Acaulosporaceae* ou de *Gigasporaceae* ont été reportées comme plus abondantes dans les communautés non perturbées (Daniell *et al.*, 2001); tandis que les genres des *Glomeraceae* sont connus comme prévalents dans les systèmes perturbés par retournement du sol (Boddington et Dodd, 2000). Cependant, l'impact du labour sur la structure des communautés de CMA n'est pas systématiquement approuvé. Par exemple, une étude de la communauté de CMA dans des prairies n'a pas abouti à la preuve d'un effet du labour (Lekberg *et al.*, 2007) et a conclu en une résilience du réseau mycélien dans le sol. De la même façon, une autre étude portant sur des prairies (Borriello *et al.*, 2012) suggère que ce n'est pas le labour mais la fertilisation azotée qui a la plus grande influence sur la structure des communautés de CMA.

Impact des fertilisations sur les CMA

L'apport de fertilisants aux champs que ce soit pour des champs arables ou pour des jachères (prairies) entretenues, est *quasi* systématique en ce qui concerne l'agriculture « classique ». Cette fertilisation est composée par des minéraux solubles, augmentant de façon instantanée pour la plante la biodisponibilité de ces éléments

dans le sol. L'azote et le phosphore prédominent bien que le potassium et le soufre viennent souvent s'y ajouter pour des raisons de composition chimique des engrais.

Durant le siècle dernier, le dépôt d'azote dans les écosystèmes terrestres a plus que doublé, via notamment les activités anthropiques (Vitousek *et al.*, 1997). Alors qu'à l'heure actuelle, l'apport des bactéries fixatrices d'azote est pris en compte dans les calculs de fertilisations raisonnées, celle des CMA ne l'est toujours pas. Bien que l'impact des fertilisations sur la mycorhization par les CMA soit un sujet d'intérêt, il est difficile d'en conclure des règles générales car les effets séparés et conjoints des différentes fertilisations (N, P, K, S, etc..) sont ardues à isoler sur une communauté aux champs.

Il a été reporté que dans des sites pollués en phosphore, le taux de mycorhization des CMA était accentué lorsque la concentration en azote était faible (Blanke *et al.*, 2005). De plus, il est communément admis qu'une forte concentration en phosphore dans le sol réduit cette colonisation. Il semblerait même que les plantes « sélectionneraient », dans un premier temps, la communauté de CMA les colonisant selon le rapport coût de carbone/apport en phosphore et dans un deuxième temps, selon les autres bénéfices qu'elles pourraient en tirer (Kiers *et al.*, 2011). Au delà de leurs impacts sur la colonisation, les fertilisations ont aussi des effets sur les communautés de CMA. Ainsi la fertilisation azotée influence la composition à long terme de la communauté de CMA aussi bien dans les champs arables (Borriello *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; Avio *et al.*, 2013) que dans les prairies semi-arides (Porrás-Alfaro *et al.*, 2007).

Cependant, la fertilisation et la perturbation du sol ne sont pas les seuls facteurs influençant la structure de la communauté de CMA.

2. Autres facteurs influençant les CMA

Des études ont reporté des variations de la structure des communautés de CMA dues à la saison (Allen *et al.*, 1995; Daniell *et al.*, 2001) ou tout simplement en fonction de l'âge de la succession de la communauté végétale. Ainsi, un changement de communauté de CMA a-t-il été montré entre deux stades de succession (Johnson *et al.*, 1991). De plus, une étude comparant la communauté de CMA dans une forêt tropicale entre jeunes plantes et les mêmes plantes plus âgées (Husband *et al.*, 2002) a montré que les espèces changent au fil du temps : les espèces fréquemment trouvées dans les jeunes plantes sont remplacées les années suivantes par d'autres espèces, plus rares auparavant.

Les paramètres physiques du sol sont aussi impliqués dans la structuration de la communauté de CMA. Ainsi, la composition du sol (le type de sol) serait un facteur fondamental de la composition de la communauté de CMA en propagules (Oehl *et al.*, 2010). De plus, le pH a aussi été reporté comme étant un facteur abiotique qui influence d'une façon majeure la structuration des communautés de CMA par la création de niche écologique (Dumbrell *et al.*, 2010). Les précipitations, la température et la latitude ont aussi été proposées pour expliquer les distributions géographiques des espèces de CMA au sein de la communauté (Johnson *et al.*, 2010). Dans une étude (Öpik *et al.*, 2006) comparant 16 travaux basés sur des racines colonisées, les auteurs ont souligné que la composition de la communauté de CMA était relative au type d'écosystème considéré et que les écosystèmes prairiaux montraient une plus importante diversité que les forêts ou les champs. Enfin, la répartition des différentes espèces au sein de la communauté est variable.

En outre, les interactions prononcées entre plantes et champignons (Klironomos *et al.*, 2001; Pivato *et al.*, 2007) suggèrent une certaine spécificité d'hôte de sorte que des plantes qui coexistent au sein d'un même écosystème peuvent arborer des communautés de CMA différentes (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003; Sýkorová *et al.*, 2007b; Li *et al.*, 2010). Cependant, une étude de comparaison de travaux sur les communautés de CMA dans différents écosystèmes possédant des espèces végétales variées a montré que certaines espèces de CMA semblent être ubiquistes et d'autres spécifiques (Öpik *et al.*, 2006) mais qu'à cette échelle d'étude, le type d'écosystème influence probablement plus la structure de la communauté de CMA que la spécificité d'hôte.

Au sein du compartiment sol, les CMA ne sont pas les seuls micro-organismes présents à interagir avec les plantes puisque d'autres communautés de bactéries ou champignons sont présentes. Les interactions entre ces micro-organismes et les CMA, et particulièrement leur régulation au sein de l'écosystème, sont assez peu connues bien qu'elles soient de plus en plus étudiées. Ainsi, une association symbiotique entre une bactérie gram-négative en forme de bâtonnet (Bonfante *et al.*, 1994) nommée « *Candidatus Glomerobacter gigasporarum* » a été mise en évidence chez l'espèce de CMA *Gigaspora margarita* (Bianciotto *et al.*, 2003) puis plus largement chez plusieurs espèces de *Gigaspora* et de *Scutellospora* (Mondo *et al.*, 2012). Le séquençage du génome de cet endosymbiote a révélé qu'il serait dépendant de son hôte et qu'en contrepartie, il contribuerait aux aptitudes écologiques de son hôte fongique par des interactions nutritives (Ghignone *et al.*, 2012). De plus, ce symbiote serait transmis d'une génération à l'autre de champignon (Bianciotto *et al.*, 2003) et affecterait le profil métabolique de son hôte fongique (Salvioli *et al.*, 2010) et ce depuis au moins 400 millions d'années (Mondo *et al.*, 2012). A ce type de symbiose restreinte puisqu'uniquement reportée dans la famille des *Gigasporaceae*, vient s'ajouter un autre type d'interactions avec des bactéries endosymbiotiques. Ces dernières, appelées endobactéries proches des *Mollicutes* (Adare *et al.*, 2008), ont été retrouvées chez différentes espèces appartenant à trois des quatre ordres de CMA à partir d'échantillons issus de cultures de collections (Naumann *et al.*, 2010) ou à partir d'échantillons environnementaux (Desiro *et al.*, 2013).

Enfin, il existe des interactions entre champignons au sein de la communauté des CMA (van Tuinen *et al.*, 1998; Gustafson et Casper, 2006; Jansa *et al.*, 2008) qui n'ont, à ce jour, pas encore livré tous leurs secrets.

L'ensemble de ces découvertes présentées dans les articles publiés dénote de la complexité des interactions au sein d'un écosystème donné et la difficulté d'obtenir une vue d'ensemble des paramètres qui agissent au sein de cet écosystème. C'est pourquoi, l'ensemble des études répertoriées à ce jour se focalise sur une partie de ces interactions. Néanmoins, avec l'évolution majeure des méthodes moléculaires de ces dernières années, l'apparition d'informations plus globales, bien qu'encore restreintes, ont permis d'accroître la compréhension de l'écologie des CMA.

IV. Evolution des outils pour l'étude de la diversité des CMA

A. Différents échantillons pour différentes questions

En premier lieu, l'analyse de la communauté de CMA peut être basée soit sur des échantillons de sol estimant ainsi le pouvoir mycorhizogène du sol ; soit sur des échantillons de racines donnant cette fois une vue

d'ensemble de la communauté symbiotique active. Chaque type d'échantillons (sol vs. racine) présente des avantages et des inconvénients.

En effet, lorsqu'un échantillon de sol est utilisé, il peut contenir des spores des espèces qui les produisent dans le sol ainsi que des hyphes extra-radiculaires. Dans la mesure où les spores sont des formes de résistance qui peuvent survivre dans le sol et germer spontanément, ce type d'échantillon ne reflète pas forcément la présence d'espèces engagées dans la symbiose mycorhizienne (Clapp *et al.*, 1995; Renker *et al.*, 2005). De plus, il est connu que les espèces diffèrent dans leur capacité à former des spores dans le sol et que la densité de spores dans le sol peut varier puisqu'une saisonnalité de sporulation a été démontrée (Bever, 2001). *A contrario*, un échantillon de racines, peut contenir des vésicules, des hyphes intraradiculaires, des arbuscules et des spores pour les espèces qui les forment au sein des racines.

Dans l'étude des communautés de CMA, selon le type d'échantillon utilisé, les méthodes peuvent changer. La méthode la plus couramment utilisée à l'heure actuelle et la plus simple est l'extraction de l'ADN total de l'échantillon. A partir d'échantillons racinaires est alors obtenu un mélange d'ADN de la plante et des micro-organismes présents dans celle-ci tandis qu'à partir d'échantillons de sol, c'est un mélange d'ADN de tous les microorganismes du sol qui sera collecté. Pour les échantillons racinaires, d'autres techniques existent telles que la colonisation racinaire et la microdissection laser. Même si la coloration des racines colonisées par les CMA peut donner des informations sur la fréquence et le taux de mycorhization des plantes, cette technique reste limitée dans les informations taxonomiques qu'elle fournit (Merryweather et Fitter, 1998) et est souvent utilisée en complément de l'extraction d'ADN. La microdissection laser permet, quant à elle, d'isoler entre autre les cellules contenant des arbuscules (Behm et Kiers, 2014) mais continue d'être une méthode peu usitée car coûteuse en terme de temps et de matériels. Pour les échantillons de sol, hormis l'extraction d'ADN, les méthodes sont restreintes à l'isolation des spores et à l'étude morphologique de ces dernières pour l'identification des CMA.

Lors d'études utilisant à la fois des d'échantillons de sol et de racines, il a été reporté des différences de communautés de CMA selon le type d'échantillon (Börstler *et al.*, 2006; Hempel *et al.*, 2007) mais aussi parfois une grande similarité entre échantillons de sol et de racine (Borriello *et al.*, 2012).

B. De la morphologie aux méthodes de séquençage haut-débit

L'étude de la diversité passe non seulement par l'étude de la richesse taxonomique, ou nombre de taxa, mais aussi par l'étude de l'abondance de ces taxa au sein de la communauté (Konopka, 2009).

L'étude de la diversité des communautés et des populations de CMA, tout comme celle de la taxonomie et de la phylogénie de ce phylum a aussi évolué passant du comptage de spores dans le sol et de leur identification par critères morphologiques à l'établissement d'autres méthodes et en particulier à l'élaboration de méthodes moléculaires basées sur l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) d'extrait d'ADN. Selon la nature du marqueur génétique choisi, la PCR peut être simple, à savoir une seule paire amorces, ou nichée (=PCR gigogne) par l'emploi de deux PCR successives nécessitant chacune un couple d'amorces dont la seconde paire est souvent plus spécifique que la première. Cette dernière est souvent usitée lorsque le marqueur ciblé est en simple

copie dans le génome ou lorsque la quantité d'ADN est en faible quantité. Les produits PCR sont le plus souvent séquencés par la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) qui nécessite, dans la plupart des cas, un clonage préalable des produits PCR puisque plusieurs espèces, populations et isolats y sont présents. Cette méthode a été utilisée dans les analyses de populations intraspécifiques de CMA mais plus largement dans les analyses de communautés de CMA notamment car elle permet l'obtention de séquences allant jusqu'à 1000 bp en un seul séquençage. Mais cette méthode de séquençage est coûteuse dans le cas de nombreux échantillons, par exemple lors de l'analyse de communautés.

Afin d'éviter un séquençage systématique des produits PCR obtenus, plusieurs méthodes de hautes résolutions, appelées empreintes moléculaires, ont été développées. Ainsi, l'électrophorèse sur gel avec gradient dénaturant (DGGE) (Hassan *et al.*, 2011), l'électrophorèse sur gel à gradient de température (TGGE) (Cornejo *et al.*, 2004), le polymorphisme de conformation simple brin (SSCP) (Jansa *et al.*, 2003; Sanchez-Castro *et al.*, 2012), le polymorphisme de longueur du fragment de restriction terminal (T-RFLP) (Guillot *et al.*, 2002; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004; Mummey et Rillig, 2006; Lekberg *et al.*, 2007; Watanarojanaporn *et al.*, 2013) ou l'analyse du polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP) (Helgason *et al.*, 1998; Sýkorová *et al.*, 2007a; Sýkorová *et al.*, 2007b; Appoloni *et al.*, 2008) ont été utilisés dans les analyses des communautés ou des populations de CMA.

Puis l'automatisation du séquençage a abouti au développement de la méthode de séquençage haut-débit, le « pyroséquençage » (Ronaghi *et al.*, 1996; Gharizadeh *et al.*, 2004) qui présente l'avantage de ne pas effectuer manuellement la phase de clonage et de passer de nombreux échantillons en même temps par l'ajout de « code-barres nucléotidiques » permettant de différencier les échantillons lors de l'analyse des résultats (Ronaghi, 2001). Cette méthode fait l'objet, de nos jours, d'un grand engouement car ces dernières années, la longueur des séquences obtenues a considérablement augmenté allant jusqu'à environ 600 bp.

L'interprétation quantitative, ou semi-quantitative, des résultats issus de ces différentes méthodes reste un débat toujours d'actualité puisqu'elles ont été décrites à la base comme des méthodes qualitatives. En effet, pour étudier la diversité des CMA, les abondances relatives (ou proportions) des espèces de CMA sont communément utilisées comme données quantitatives. Par exemple, dans la méthode de RFLP, ce sont les abondances relatives des différents patrons de digestion enzymatique au sein des échantillons qui permettent de reconstituer l'assemblage de la communauté de CMA (Helgason *et al.*, 1998) ou d'étudier celui des populations (Börstler *et al.*, 2010). Il en est de même pour les méthodes de clonage-séquençage ou de pyroséquençage où des biais des méthodes ont été soulignés (Alkan *et al.*, 2004; Amendt *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2010). Cependant, l'utilisation semi-quantitative des données issues du clonage-séquençage d'amplicons obtenus par PCR nichée a été considérée comme valide (Kohout *et al.*, 2014). De même, une unicité des résultats a été trouvée entre pyroséquençage et clonage-séquençage à partir de PCR simple (Öpik *et al.*, 2009) ou encore entre PCR quantitative et pyroséquençage d'amplicons de PCR nichée (Stockinger *et al.*, sous presse). Enfin, même si des méthodes de PCR quantitatives en temps réel ont été décrites et utilisées chez les CMA avec succès en conditions restreintes, des études ont conclu que cette méthode ne reflète pas vraiment l'abondance du champignon ni son activité physiologique (Gamper *et al.*, 2008; Robinson-Boyer *et al.*, 2009). C'est pourquoi, l'utilisation de données

quantitatives ou semi-quantitatives peut être faite à condition d'en interpréter les résultats de façon parcimonieuse en gardant à l'esprit les différents biais de ces méthodes.

L'ensemble de ces techniques d'analyse des communautés de CMA passe par une phase d'identification des CMA qui doit être la plus précise possible, à savoir au niveau de l'espèce voire au niveau infra-spécifique. Cette identification nécessite d'avoir une base de données de référence spécifique, préalablement établie, pour la méthode et le marqueur utilisés. Ces bases de données de référence sont classiquement obtenues suite à l'application de la méthode et du marqueur choisis sur des spores issues de cultures pures de collections. Les séquences obtenues lors de l'étude sont alors regroupées par homologie de séquences formant des Unités Taxonomiques Opérationnelles, « OTUs » (*cf.* paragraphe notion d'espèces). L'homologie entre séquences est déterminée par le marqueur utilisé durant l'étude et son pouvoir de résolution spécifique (*cf.* paragraphes suivants) qui est généralement de l'ordre de 97-99 %. Une séquence est utilisée comme étant représentative de chaque OTU. Cette séquence représentative, souvent consensus, est assignée phylogénétiquement, par homologie, à une base de données de séquences de référence pour lesquelles l'espèce et l'isolat sont connus. La position de l'OTU dans l'arbre alors créé permet de déterminer l'espèce de CMA, voire l'isolat, à laquelle appartient cet OTU. Lorsque ces OTUs ont une même assignation taxonomique, elles sont souvent regroupées au sein de « Taxons moléculaires », terme qui sera utilisé tout au long de cette thèse. Il n'est pas rare que des OTUs n'aient pas d'identité spécifique précise. En effet, les bases de données contiennent de nombreuses séquences environnementales qui ne correspondent pas aux espèces décrites car les CMA, rappelons-le, ne sont pas aisées à cultiver seuls.

Comme chacune des méthodes citées a ses avantages et ses inconvénients notamment en termes de labour ou d'investissement pécuniaire, le choix de la méthode se fait aussi, en plus de la question posée, en fonction des marqueurs disponibles pour celle-ci.

C. Les différents marqueurs génétiques disponibles

Il existe plusieurs gènes utilisables en tant que marqueurs génétiques et pour chacun d'entre eux, il y a différentes amorces décrites possibles. Le marqueur et les amorces utilisés vont être différents selon l'échelle étudiée (inter- ou intra- spécifique) et/ou selon la méthode employée puisque ce choix peut en partie déterminer les résultats qui seront obtenus. En effet, il a été observé (Hijri *et al.*, 2006) une diversité de CMA plus importante que celles retrouvées auparavant avec d'autres amorces (Helgason *et al.*, 1998; Daniell *et al.*, 2001). De plus, une étude récente comparant les résultats de plusieurs marqueurs utilisés sur les mêmes échantillons a montré que la diversité de CMA observée pouvait être biaisée selon le type d'amorces utilisé (Kohout *et al.*, 2014). Il faut donc avant toute chose bien choisir son marqueur et ses amorces. Les marqueurs varient dans leur pouvoir de résolution spécifique, c'est-à-dire dans leurs capacités à distinguer des espèces de CMA très proches (Stockinger *et al.*, 2010). Pour l'étude des CMA, ces régions d'ADN amplifiées doivent donc suffisamment varier entre les différentes espèces afin de pouvoir les distinguer tout en permettant d'amplifier l'intégralité des espèces de CMA. Il en va de même aux échelles des populations ou des isolats. De plus, une base de données de référence doit être disponible pour le marqueur donné et en particulier pour la région amplifiée par les amorces choisies. Pour l'étude des CMA, Il existe

ainsi plusieurs gènes marqueurs fréquemment utilisés pour lesquels de nombreuses amorces sont décrites que ce soit à l'échelle interspécifique ou intraspécifique.

1. Echelle interspécifique

Les plus connus et les usités des gènes marqueurs correspondent à une région de l'ADN nucléaire ribosomique codant les différents ARN ribosomiques, ARNr qui composent avec les protéines ribosomiques, le ribosome. Dans ce ribosome, sont distinguées deux sous-unités : la grande sous-unité et la petite sous-unité (Mathimaran *et al.*, 2005; Mummey et Rillig, 2006). La grande sous-unité, LSU (aussi nommée 60S) comprend trois molécules d'ARNr : 5S, 28S et 5,8S. La petite sous-unité, SSU (nommée 40S), contient une molécule d'ARNr : le 18S. Les séquences ADN qui codent les ARNr 18S, 5,8S et 28S sont proches sur le génome bien que séparées par deux espaceurs transcrits internes : l'ITS1 et l'ITS2, Figure 1.5. Ainsi, de nombreuses amorces permettant d'amplifier des parties de longueurs variables de ces ARNr ont été conçues, Figure 1.5. Le LSU et le SSU sont deux marqueurs très usités car ils comportent à la fois des régions très variables et d'autres très conservées (Mathimaran *et al.*, 2005; Mummey et Rillig, 2006).

Les premières amorces ciblant le SSU des CMA ont été VANS1 (Simon *et al.*, 1992) et le couple d'amorces AM1-NS31 (Helgason *et al.*, 1998). Au même moment, l'amplification partielle du LSU a été possible puisque l'ADN qui code pour l'ARNr 5,8S a pu être amplifié grâce aux amorces ITS1, ITS4, NS5 (White *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 1995; Redecker *et al.*, 1997, Redecker *et al.*, 1999). D'autre part, la séquence codant pour l'ARNr 25S a pu être utilisée en tant que marqueur (van Tuinen *et al.*, 1998; Kjølner et Rosendahl, 2000). Cependant, certains de ces couples d'amorces n'amplifient pas tous les groupes de *Glomeromycota*, comme cela a été montré pour le couple d'amorces « AM1-NS31 » (Redecker *et al.*, 2003), et/ou amplifient d'autres groupes (Douhan *et al.*, 2005). Afin de diminuer le risque de ne pas amplifier tous les taxons de CMA, il est possible d'utiliser plusieurs couples d'amorces ciblant chacun des taxons spécifiques des CMA. De par son grand polymorphisme, le SSU est utilisable pour le développement d'amorces spécifiques à certains groupes de CMA (Rosendahl et Matzen, 2008) et des amorces de ce type ont été développées par Redecker (2000), Figure 1.5. Cependant, les séquences obtenues n'étaient de la même longueur ce qui rend son utilisation incompatible avec les méthodes de séquençage haut-débit.

Plus récemment, une approche par PCR nichée qui permet, grâce à un mélange d'amorces, d'amplifier l'ensemble des *Glomeromycota* a été développée tout en présentant une haute spécificité aux Glomérormycètes, Figure 1.5 (Krüger *et al.*, 2009). La partie amplifiée inclut une grande partie des régions des gènes généralement utilisés dans les études moléculaires des *Glomeromycota*. Cependant, cette région amplifiée ne comprend pas une partie du SSU qui a été utilisée dans certaines études de diversité (Helgason *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2008). En effet, ces amorces amplifient une partie du SSU, l'intégralité de l'ITS1 et de l'ITS2 ainsi qu'une partie du LSU et permettent ainsi d'obtenir des fragments d'une longueur approximative de 1400-1600 bp. Grâce au séquençage de nombreuses souches de CMA, une grande base de données de référence de ce marqueur est disponible, ce qui permet d'atteindre une résolution spécifique (Krüger *et al.*, 2009). Ce fragment est néanmoins incompatible avec la méthode de pyroséquençage à l'heure actuelle de par sa longueur trop imposante d'environ 1500 bp.

Des marqueurs propices à la méthode de séquençage haut-débit ont alors été recherchés. Le choix de l'utilisation des ITS (espaceurs transcrits internes) en tant que marqueurs chez les champignons s'est fait car, d'une

part, ils sont facilement amplifiables (de par le grand nombre de copies des gènes d'ARNr) ; d'autre part, car ils présentent de très grandes variations entre espèces proches et parfois au niveau infra-spécifique (Jansa *et al.*, 2002b; Stockinger *et al.*, 2010).

Une combinaison des avantages des amorces précédemment citées pour l'étude de la diversité des CMA peut être utilisée. En alliant spécificité aux Glomérormycètes (avec les amorces de Krüger en première PCR) ainsi que fort pouvoir de résolution spécifique (amorces ciblant l'ITS2), il est possible d'obtenir une méthodologie compatible avec l'utilisation du séquençage haut-débit.

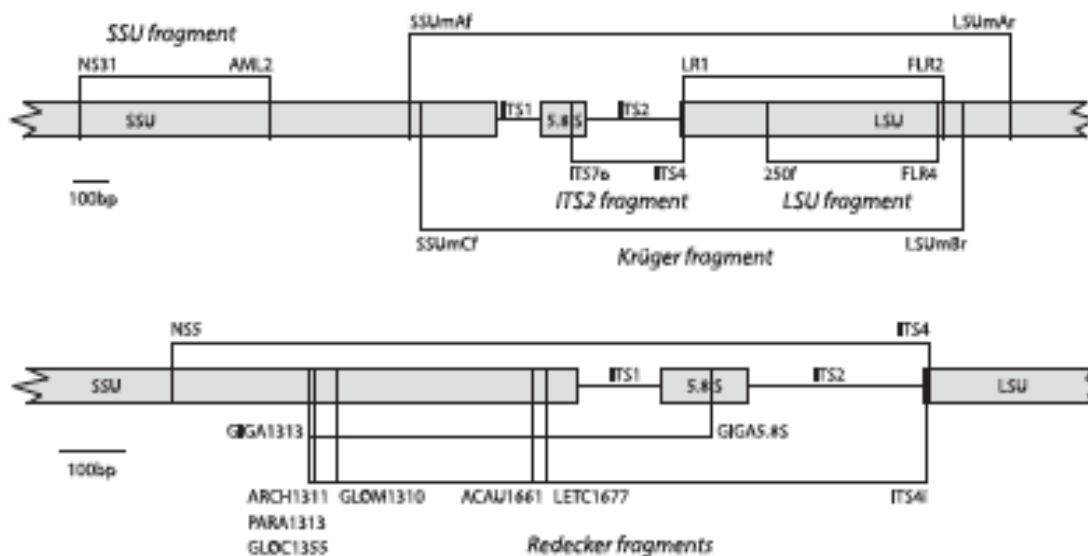


Figure 1.5: Schéma des différentes amorces utilisées pour l'amplifier l'ADNr codant pour les molécules d'ARNr composant le ribosome dans l'étude de Kohout *et al.* (2014). La partie basse représente les amorces issues de Redecker *et al.* (2000).

Bien que l'ITS soit le code-barre officiel chez les champignons, un code-barre secondaire codant pour une protéine a été proposé pour les champignons (Schoch *et al.*, 2012). Ce type de gènes est en général en simple copie dans le génome, ce qui présente l'avantage de diminuer le nombre de variants possibles. Parmi les gènes codant pour des protéines, trois d'entre eux ont été utilisés en phylogénie des champignons : le gène codant pour le facteur d'élongation 1 alpha et les gènes RPB1 et RPB2 codant pour des sous-unités de l'ARN polymérase II (Helgason *et al.*, 2003; Tanabe *et al.*, 2004; James *et al.*, 2006). C'est le RPB1 qui a été sélectionné comme code barre secondaire des *Fungi* (Schoch *et al.*, 2012). En effet, ce marqueur a pour autre avantage de ne pas présenter de polymorphisme au sein des isolats de CMA, facilitant la distinction d'espèces proches chez les CMA (Redecker et Raab, 2006). Il a de surcroît, un pouvoir de résolution spécifique supérieur à celui de l'ITS chez les champignons testés (Schoch *et al.*, 2012). Cependant, le nombre de séquences de références de ce gène n'a pas été jugé suffisant. Ce n'est que très récemment que des mélanges d'amorces spécifiques aux *Glomeromycota* qui permettent d'amplifier tous les CMA testés, avec une très haute spécificité, ont été développés, Figure 1.6. Les amplicons obtenus avec ces amorces sont d'une longueur approximative de 750 bp ce qui permet d'utiliser ces amorces avec la méthode de séquençage haut-débit (Stockinger *et al.*, sous presse, voir Annexe 1).



Figure 1.6: Schéma représentant la partie du gène RPB1 amplifiée par les couples d'amorces de PCR nichée utilisées par Stockinger *et al.* (sous presse, voir Annexe 1). En bleu, les introns ; en vert les exons. Les noms des amorces de première PCR sont indiqués en noir et celles de seconde PCR le sont en rouge.

2. Echelle intraspécifique

Alors que de nombreuses études ont été menées sur la diversité des CMA, au final peu se sont frottées à celle de la diversité populationnelle des CMA. Ce phénomène est en partie dû au faible nombre de marqueurs existants à cette échelle et à leurs performances sur des échantillons racinaires. A l'échelle intraspécifique, plusieurs amorces ont été conçues afin d'étudier les populations d'un nombre restreint d'espèces de CMA. Ainsi, grâce à des amorces ciblant le 18S, par la méthode de DGGE, certains isolats de différentes espèces de *Gigaspora* en culture ont pu être distingués (de Souza *et al.*, 2004). Or, les gènes codant les ARNr montrent une très grande variabilité même au sein d'un isolat (Jansa *et al.*, 2002b). Une autre méthode de co-dominance multiloci, utilisant comme marqueur le LSU couplé à deux gènes codant des protéines (GmFOX2 et GmTOR2), a résolu le problème d'hétérogénéité au sein d'un isolat (Stukenbrock et Rosendahl, 2005). Cette méthode a été appliquée à plusieurs reprises pour l'étude de spores d'isolats de trois espèces : *Rhizophagus irregularis*, *Funnelformis mosseae* et *Funnelformis caledonium* mais jamais sur des échantillons racinaires (Rosendahl et Matzen, 2008; Rosendahl *et al.*, 2009).

A l'heure actuelle et à ma connaissance, le seul marqueur génétique disponible et ayant suffisamment de précision pour étudier la structure des populations de *Rhizophagus irregularis* à partir d'échantillons de racines colonisées est le gène nucléaire de la mitochondrie codant pour la grande sous-unité de l'ARN ribosomal (mtLSU), Figure 1.7.

Ce marqueur mtLSU a été utilisé chez les champignons (Guillot *et al.*, 2002; Printzen, 2002) et a été identifié comme marqueur moléculaire chez les CMA (Raab *et al.*, 2005). Aussi, une méthode d'amplification du mtLSU par PCR nichée a été développée grâce aux amorces présentées en Figure 1.8 (Börstler *et al.*, 2008). La longueur des amplicons obtenus peut varier de 1000 bp à 4000 bp à cause de la présence d'introns. Börstler *et al.* (2008) ont démontré que les séquences du mtLSU étaient homogènes au sein des isolats. Grâce à la structure du mtLSU, ces mêmes auteurs ont pu distinguer douze isolats sur les 16 testés, définissant ainsi des haplotypes. Les auteurs ont aussi montré que ce marqueur moléculaire présente un polymorphisme de séquences au sein de l'espèce *Rhizophagus irregularis*, suffisant d'une part pour différencier des haplotypes au niveau intraspécifique, et d'autre part pour étudier la structure et la répartition de ces populations au champ (Börstler *et al.*, 2010).

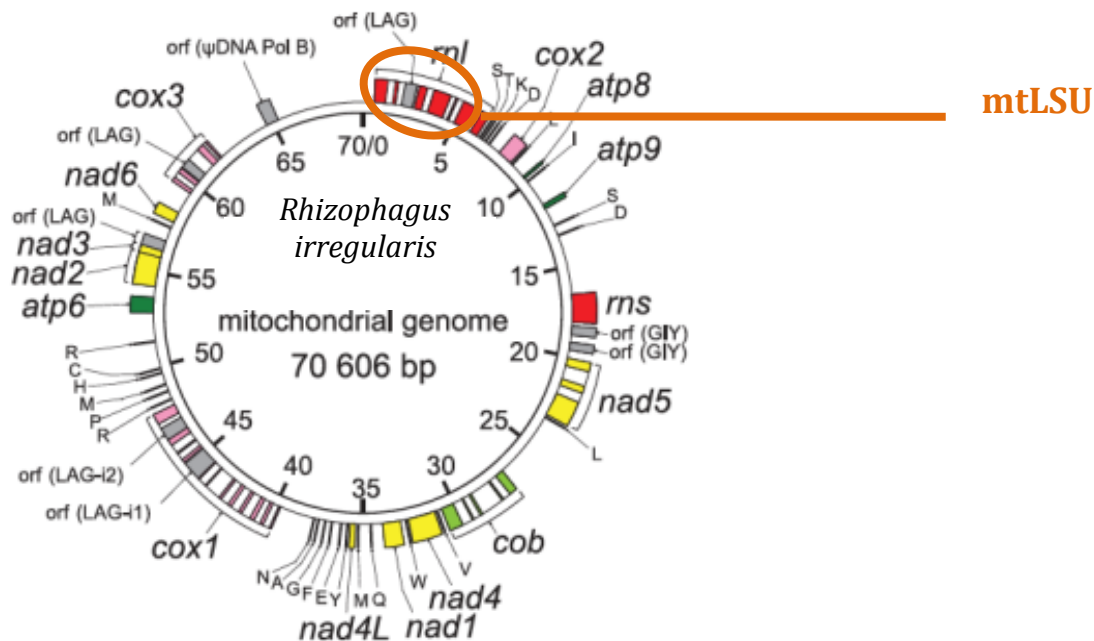


Figure 1.7 : Emplacement du gène marqueur mtLSU, codant pour la grande sous-unité de l'ARN ribosomal, au sein du génome mitochondrial. Figure modifiée de (Lee et Young, 2009).

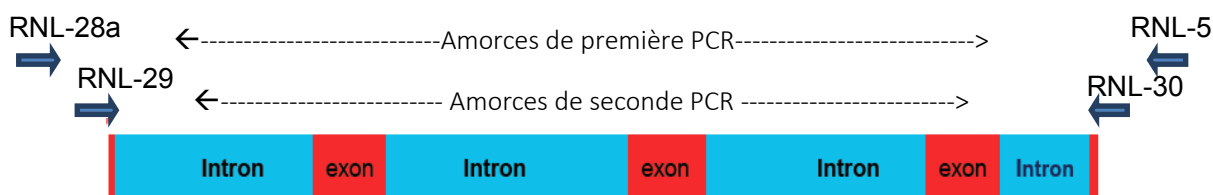


Figure 1.8: Schéma représentant la structure en introns (bleu) et exons (rouge) du gène marqueur mtLSU et les amorces utilisées par PCR nichée (Börstler *et al.*, 2008).

V. Objectifs de la thèse

Les connaissances en écologie des CMA ont indéniablement progressé même s'il reste de nombreuses zones d'ombre. Le but général de cette thèse est de mieux comprendre comment se structure la diversité génétique des CMA dans les écosystèmes agricoles sous l'effet des pratiques culturales et ce à plusieurs échelles. Ainsi, à très long terme, ce type d'étude pourrait aboutir à l'utilisation des services écosystémiques des CMA pour pallier aux nécessités agricoles des prochaines décennies imposées par la croissance des besoins alimentaires mondiaux.

Comme je l'ai montré dans cette synthèse, les pratiques culturales (travail du sol, fertilisations, monocultures) sont généralement reconnues comme ayant des effets néfastes sur la diversité des CMA mais l'importance de leurs effets selon le type d'usage de sol reste controversée. C'est pourquoi, j'ai concentré mes études sur deux types d'utilisation des sols, à savoir les champs cultivés et les prairies. Pour ces types d'utilisation de sol, nous avons cherché à comprendre comment les pratiques culturales actuelles influencent la structuration

de la diversité génétique des CMA non seulement par le biais de l'étude de l'impact du retournement du sol et de la fertilisation mais aussi par une approche multi-échelles que ce soit au niveau de la communauté de CMA ou au niveau des populations de l'espèce *Rhizophagus irregularis* mais aussi à plusieurs échelles géographiques allant de la micro-parcelle à l'échelle nationale française. Pour ce faire, nous avons mis en place différentes collaborations et différentes expérimentations ayant recours à plusieurs techniques moléculaires. Parmi les méthodes préalablement citées, notre choix s'est porté sur l'utilisation de deux d'entre elles: (i) le pyroséquençage pour l'analyse des communautés de CMA ; (ii) l'analyse du polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP) pour l'étude des populations de l'espèce de CMA *Rhizophagus irregularis* (Börstler *et al.*, 2008; Börstler *et al.*, 2010).

Puisque le type d'usage de sol influence l'assemblage des communautés et des populations de CMA, nous avons voulu comprendre comment s'établit et se maintient cette diversité par la simulation d'un état de transition entre prairie et culture à l'échelle de la micro-parcelle. De plus, l'influence des fertilisations azotée et phosphatée est un enjeu cultural important qui a montré des effets contradictoires sur la diversité des CMA. C'est pourquoi, dans le Chapitre 2 qui suit, je m'attache à étudier l'impact des pratiques culturales (labour et fertilisations azotée et phosphatée) sur la structuration de la diversité génétique à deux échelles : d'une part à celle de la communauté de CMA et d'autre part à celle des populations de l'espèce modèle *Rhizophagus irregularis*. Cette étude a été permise grâce à la mise en place d'une expérimentation sur le domaine expérimental de Bretenières rattaché à l'INRA de Dijon.

Nous avons souligné au cours de cette synthèse que l'utilisation de différents types d'échantillons en fonction du type de sol n'a pas toujours conduit à des résultats congruents. C'est pourquoi le Chapitre 3 traite de la variabilité de la diversité de CMA selon non seulement le type d'usage de sol (prairie vs. champs arables) mais aussi le type d'échantillons analysés (racine vs. sol) à l'échelle d'un champ. Cette étude a été rendue possible grâce à l'utilisation de données issues du projet européen ECOFINDERS auquel nous avons participé et à la mise en place d'une collaboration avec l'INRA de Lusignan.

Comme certains CMA semblent être ubiquistes et d'autres inféodés à certains écosystèmes, nous avons aussi cherché à savoir s'il existait une structuration des communautés de CMA dans les agroécosystèmes français et évaluer l'importance du type d'usage de sol et des pratiques culturales dans cette structuration si elle existe. Ainsi, dans le Chapitre 4, je m'intéresse à la structuration géographique du potentiel mycorrhizogène des CMA en France, étudiée grâce à des échantillons de sols issus de l'échantillonnage du Réseau de Qualité de Mesures (RMQS). Ces échantillons de sols proviennent de deux types d'usage de sol, prairies et cultures, et subissent des pratiques culturales différentes : monoculture ou rotations de cultures ; prairies naturelles ou semées. Ces échantillons ont été obtenus à la suite de la mise en place d'une collaboration tripartite entre notre équipe de l'INRA de Dijon, le GisSol d'Orléans et la plateforme GénoSol de l'INRA de Dijon.

Enfin, l'ensemble de ces résultats sera discuté au sein de la conclusion générale et seront remis dans le contexte pratique de l'utilisation des services écosystémiques des CMA au sein d'une agriculture durable et productive. Ce chapitre 5 fera aussi l'objet de quelques pistes de propositions de travaux de recherche pour les années futures.

Références bibliographiques de la synthèse bibliographique

- Abbott LK and Robson AD (1991) Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35: 121-150. DOI:10.1016/0167-8809(91)90048-3
- Abbott LK, Robson AD, Gazey C (1992) Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Methods Microbiology* 24: 1-21.
- Adare A, Afanasiev S, Aidala C, *et al.* (2008) Quantitative constraints on the transport properties of hot partonic matter from semi-inclusive single high transverse momentum pion suppression in Au plus Au collisions at root S-NN=200 GeV. *Physical Review C* 77: 12. DOI: 10.1103/PhysRevC.77.064907
- Ahmadjian V (1993) The lichens photobiont - What can it tell us about lichen systematics. *Bryologist* 96: 310-313. DOI: 10.2307/3243858
- Alkan N, Gadkar V, Coburn J, Yarden O, Kapulnik Y (2004) Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. *New Phytologist* 161: 877-885. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2004.00975.x
- Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170: 47-62. DOI: 10.1007/BF02183054
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19: 5555-5565. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x
- Appoloni S, Lekberg Y, Tercek MT, Zabinski CA, Redecker D (2008) Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of geothermal soils in Yellowstone National Park (USA). *Microbial Ecology* 56: 649-659. DOI: 10.1007/s00248-008-9384-9
- Auge RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42. DOI: 10.1007/s005720100097
- Avio L, Castaldini M, Fabiani A, Bedini S, Sbrana C, Turrini A, Giovannetti M (2013) Impact of nitrogen fertilization and soil tillage on arbuscular mycorrhizal fungal communities in a Mediterranean agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 67: 285-294. DOI:10.1016/j.soilbio.2013.09.005
- Azcón-Aguilar C and Barea JM (1996) Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens - An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6: 457-464. DOI: 10.1007/s005720050147
- Bago B, Zipfel W, Williams RM, Piché Y (1999) Nuclei of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi as revealed by in vivo two-photon microscopy. *Protoplasma* 209: 77-89. DOI: 10.1007/BF01415703
- Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* 131: 1496-1507. DOI: 10.1104/pp.102.007765
- Baldauf SL (1999) A search for the origins of animals and fungi: Comparing and combining molecular data. *American Naturalist* 154: S178-S188. DOI: 10.1086/303292
- Baldauf SL and Palmer JD (1993) Animals and fungi are each other's closest relatives: Congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 11558-11562.
- Bartling FG (1830) *Ordines naturales plantarum*. Göttingen: 498 pp. <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.728>
- Bécard and Pfeffer PE (1993) Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in-vitro development. *Protoplasma* 174: 62-68. DOI: 10.1007/BF01404043
- Behm JE and Kiers ET (2014) A phenotypic plasticity framework for assessing intraspecific variation in arbuscular mycorrhizal fungal traits. *Journal of Ecology* 102: 315-327. DOI: 10.1111/1365-2745.12194
- Bentivenga SP and Morton JB (1994) Stability and heritability of fatty-acid methyl-ester profiles of glomalean endomycorrhizal fungi. *Mycological Research* 98: 1419-1426.
- Berbee ML and Taylor JW (1993) Dating the evolutionary radiations of the true fungi. *Canadian Journal of Botany* 71: 1114-1127. doi:10.1016/S0953-7562(09)81073-3
- Berkeley MJ and Broome CE (1873) Enumeration of the fungi of Ceylon. Part II. *Journal Society London Botany* 14:137. DOI: 10.1111/j.1095-8339.1873.tb00301.x

- Besserer A, Puech-Pages V, Kiefer P, Gomez-Roldan V, Jauneau A, Roy S, Portais JC, Roux C, Bécard G, Sejalón-Delmas N (2006) Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLOS Biology* 4: 1239-1247. DOI: [10.1371/journal.pbio.0040226](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226)
- Besserer A (2008) Étude des mécanismes d'action des strigolactones sur les champignons endomycorhiziens à arbuscules. Thèse Université Paul Sabatier, Toulouse III. <http://thesesups.ups-tlse.fr/179/>
- Bethlenfalvai GJ, Cantrell IC, Mihara KL, Schreiner RP (1999) Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biology and Fertility of Soils* 28: 356-363. DOI: [10.1007/s003740050504](https://doi.org/10.1007/s003740050504)
- Bever JD (2001) Ecological dynamics within the plant-AM fungal mutualism. 3rd International Conference on Mycorrhizas. University of Adelaide, Adelaide, Australia.
- Bianciotto V, Lumini E, Bonfante P, Vandamme P (2003) '*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov, sp nov, an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 121-124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12656162>
- Biermann B and Linderman RG (1983) Use of vesicular arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95: 97-105. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1983.tb03472.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1983.tb03472.x)
- Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426-438. DOI: [10.3732/ajb.1000298](https://doi.org/10.3732/ajb.1000298)
- Blackwell M, Vilgalys R, James TY, Taylor JW (2012) *Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.* Version 30 January 2012. <http://tolweborg/Fungi/2377/20120130> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweborg/>.
- Blanke V, Renker C, Wagner M, Fullner K, Held M, Kuhn AJ, Buscot F (2005) Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. *New Phytologist* 166: 981-992. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2005.01374.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01374.x)
- Blaskowski J, Czerniawska B, Wubet T, Schafer T, Buscot F, Renker C (2008) *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the *Glomeromycota*. *Mycotaxon* 106: 247-267. <http://www.mycotaxon.com/vol/abstracts/106/106-247.html>
- Blaskowski J (2012) *Glomeromycota*. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków. 303pp.
- Boddington CL and Dodd JC (2000) The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. II. Studies in experimental microcosms. *Plant and Soil* 218: 145-157. DOI: [10.1023/A:1014966801446](https://doi.org/10.1023/A:1014966801446)
- Bonfante P, Balestrini R, Mendgen K (1994) Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker and Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze-substitution. *New Phytologist* 128: 93-101. <http://www.jstor.org/stable/2557836>
- Borriello R, Lumini E, Girlanda M, Bonfante P, Bianciotto V (2012) Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biology and Fertility of Soils* 48: 911-922. DOI: [10.1007/s00374-012-0683-4](https://doi.org/10.1007/s00374-012-0683-4)
- Börstler B, Renker C, Kahmen A, Buscot F (2006) Species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in two mountain meadows with differing management types and levels of plant biodiversity. *Biology and Fertility of Soils* 42: 286-298. DOI: [10.1007/s00374-005-0026-9](https://doi.org/10.1007/s00374-005-0026-9)
- Börstler B, Raab PA, Thiéry O, Morton JB, Redecker D (2008) Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytologist* 180: 452-465. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2008.02574.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02574.x)
- Börstler B, Thiéry O, Sýkorová Z, Berner A, Redecker D (2010) Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497-1511. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2010.04590.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04590.x)
- Buée M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G (2000) The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 693-698. <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.6.693>
- Cardenas-Flores A, Draye X, Bivort C, Cranenbrouck S, Declerck S (2010) Impact of multispores in vitro subcultivation of *Glomus* sp MUCL 43194 (DAOM 197198) on vegetative compatibility and genetic diversity detected by AFLP. *Mycorrhiza* 20: 415-425. DOI: [10.1007/s00572-009-0295-5](https://doi.org/10.1007/s00572-009-0295-5)

- Casieri L, Lahmidi NA, Doidy J, Veneault-Fourrey C, Migeon A, Bonneau L, Courty PE, Garcia K, Charbonnier M, Delteil A, Brun A, Zimmermann S, Plassard C, Wipf D (2013) Biotrophic transportome in mutualistic plant-fungal interactions. *Mycorrhiza* 23: 597-625. DOI: [10.1007/s00572-013-0496-9](https://doi.org/10.1007/s00572-013-0496-9)
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130: 259-265. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1995.tb03047.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb03047.x)
- Cornejo P, Azcón-Aguilar C, Barea JM, Ferrol N (2004) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters* 241: 265-270. DOI: [10.1016/j.femsle.2004.10.030](https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.10.030)
- Croll D, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, Sanders IR (2008) Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 181: 924-937. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2008.02726.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02726.x)
- Croll D and Sanders IR (2009) Recombination in *Glomus intraradices*, a supposed ancient asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *BMC Evolutionary Biology* 9: 13. DOI: [10.1186/1471-2148-9-13](https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-13)
- Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 10494-10499. DOI: [10.1073/pnas.142680199](https://doi.org/10.1073/pnas.142680199)
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203-209. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2001.tb00841.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00841.x)
- de la Providencia IE, de Souza FA, Fernandez F, Delmas NS, Declerck S (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. *New Phytologist* 165: 261-271. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2004.01236.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01236.x)
- de la Providencia IE, Nadimi M, Beaudet D, Rodriguez Morales G, Hijri M (2013). Detection of a transient mitochondrial DNA heteroplasmy in the progeny of crossed genetically divergent isolates of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 200(1): 211-221. DOI: [10.1111/nph.12372](https://doi.org/10.1111/nph.12372)
- de Souza FA, Kowalchuk GA, Leeflang P, van Veen JA, Smit E (2004) PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1413-1424. DOI: [10.1128/AEM.70.3.1413-1424.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1413-1424.2004)
- Declerck S, Strullu DG, Plenchette C (1998) Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germplasm collection. *Mycologia* 90: 579-585. DOI: <http://www.jstor.org/stable/3761216>
- Delaux P-M, Bécard G, Combier J-P (2013) NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytologist* 199: 59-65. DOI: [10.1111/nph.12340](https://doi.org/10.1111/nph.12340)
- den Bakker HC, VanKuren NW, Morton JB, Pawlowska TE (2010) Clonality and recombination in the life history of an asexual arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Biology and Evolution* 27: 2474-2486. DOI: [10.1093/molbev/msq155](https://doi.org/10.1093/molbev/msq155)
- de Quieroz K (2007) Species concept and species delimitation. *Systematic biology* 56: 879-886. DOI: [10.1080/10635150701701083](https://doi.org/10.1080/10635150701701083)
- Desiro A, Naumann M, Epis S, Novero M, Bandi C, Genre A, Bonfante P (2013) Mollicutes-related endobacteria thrive inside liverwort-associated arbuscular mycorrhizal fungi. *Environmental Microbiology* 15: 822-836. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2012.02833.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02833.x)
- Douds DD and Millner P (1999) Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment* 74: 77-93. doi:10.1016/S0167-8809(99)00031-6
- Douhan GW, Petersen C, Bledsoe CS, Rizzo DM (2005) Contrasting root associated fungi of three common oak-woodland plant species based on molecular identification: host specificity or non-specific amplification? *Mycorrhiza* 15: 365-372. DOI: [10.1007/s00572-004-0341-2](https://doi.org/10.1007/s00572-004-0341-2)
- Dueck TA, Visser P, Ernst WHO, Schat H (1986) Vesicular-arbuscular mucorrhizae decrease zinc-toxicity to grasses growing in zinc-polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry* 18: 331-333. doi:10.1016/0038-0717(86)90070-2
- Dumbrell AJ, Nelson M, Helgason T, Dytham C, Fitter AH (2010) Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal* 4: 337-345. DOI: [10.1038/ismej.2009.122](https://doi.org/10.1038/ismej.2009.122)
- Evans DG and Miller MH (1990) The role of the external mycelial network in the effect of soil disturbance upon vesicular arbuscular mycorrhizal colonization of maize. *New Phytologist* 114: 65-71. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1990.tb00374.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00374.x)

- Faceli K, Sakata TC, de Souto MCP, de Carvalho A (2010) Partitions selection strategy for set of clustering solutions. *Neurocomputing* 73: 2809-2819. DOI: [10.1016/j.neucom.2010.03.028](https://doi.org/10.1016/j.neucom.2010.03.028)
- Fortin JA, Bécard G, Declerck S, Dalpe Y, St Arnaud M, Coughlan AP, Piché Y (2002) Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. *Canadian Journal of Botany* 80: 1-20. DOI: [10.1139/b01-139](https://doi.org/10.1139/b01-139)
- Francis R, Finlay RD, Read DJ (1986) Vesicular arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. 4. Transfert of nutrients in inter-specific and intra-specific combinations of host plants. *New Phytologist* 102: 103-111. DOI: <http://www.jstor.org/stable/2484985>
- Gamper HA, Young JPW, Jones DL, Hodge A (2008) Real-time PCR and microscopy: Are the two methods measuring the same unit of arbuscular mycorrhizal fungal abundance? *Fungal Genetics and Biology* 45: 581-596. DOI: [10.1016/j.fgb.2007.09.007](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.09.007)
- Gaur A and Adholeya A (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86: 528-534.
- Genre A, Chabaud M, Balergue C, Puech-Pages V, Novero M, Rey T, Fournier J, Rochange S, Bécard G, Bonfante P, Barker DG (2013) Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca^{2+} spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytologist* 198: 179-189. DOI: [10.1111/nph.12146](https://doi.org/10.1111/nph.12146)
- Gerdemann JW and Trappe JM (1974) The *Endogonaceae* in the Pacific Northwest. Mycologia Memoir n° 5. *The New York botanical garden and the mycological society of America* 17.
- Gharizadeh B, Eriksson J, Nourizad N, Nordstrom T, Nyren P (2004) Improvements in pyrosequencing technology by employing sequenase polymerase. *Analytical Biochemistry* 330: 272-280. DOI: [10.1016/j.ab.2004.03.018](https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.03.018)
- Ghignone S, Salvioli A, Anca I, Lumini E, Ortu G, Petiti L, Cruveiller S, Bianciotto V, Piffanelli P, Lanfranco L, Bonfante P (2012) The genome of the obligate endobacterium of an AM fungus reveals an interphylum network of nutritional interactions. *The ISME Journal* 6: 136-145. DOI: [10.1038/ismej.2011.110](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.110)
- Ghiselin MT (1987) Species concepts, individuality, and objectivity. *Biology and Philosophy* 2:127-143. DOI: [10.1007/BF00057958](https://doi.org/10.1007/BF00057958)
- Gianinazzi S, Dexheimer J, Gianinazzipearson V, Marx C (1983) Role of the host-arbuscule interface in the VA mycorrhizal symbiosis-Ultracytological studies of processes involved in phosphate and carbohydrate exchange. *Plant and Soil* 71: 211-215. DOI: [10.1007/BF02182656](https://doi.org/10.1007/BF02182656)
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519-530. DOI: [10.1007/s00572-010-0333-3](https://doi.org/10.1007/s00572-010-0333-3)
- Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S (1989) In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* 7: 243-255.
- Giovannetti M, Azzolini D, Citernesi AS (1999) Anastomosis formation and nuclear and protoplasmic exchange in arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5571-5575.
- Giovannetti M, Fortuna P, Citernesi AS, Morini S, Nuti MP (2001) The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 151: 717-724. DOI: [10.1046/j.0028-646x.2001.00216.x](https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00216.x)
- Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L (2003) Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 616-624. DOI: [10.1128/AEM.69.1.616-624.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.616-624.2003)
- Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture Ecosystems and Environment* 113: 17-35. DOI: [10.1016/j.agee.2005.09.009](https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.09.009)
- Guillot J, Demanche C, Hugot JP, Berthelemy M, Wakefield AE, Dei-Cas E, Chermette R (2002) Parallel phylogenies of *Pneumocystis* species and their mammalian hosts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*: 113S-115S.
- Gustafson DJ and Casper BB (2006) Differential host plant performance as a function of soil arbuscular mycorrhizal fungal communities: experimentally manipulating co-occurring *Glomus* species. *Plant Ecology* 183: 257-263. DOI: [10.1007/s11258-005-9037-8](https://doi.org/10.1007/s11258-005-9037-8)
- Harris JK, Sahl JW, Castoe TA, Wagner BD, Pollock DD, Spear JR (2010) Comparison of normalization methods for construction of large, Multiplex amplicon pools for next-generation sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3863-3868. DOI: [10.1128/AEM.02585-09](https://doi.org/10.1128/AEM.02585-09)

- Hassan SED, Boon E, St-Arnaud M, Hijri M (2011) Molecular biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in trace metal-polluted soils. *Molecular Ecology* 20: 3469-3483. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05142.x)
- Hauser M, Narita V, Donhardt AM, Naider F, Becker JM (2001) Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Membrane Biology* 18: 105-112.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431. DOI: [10.1038/28764](https://doi.org/10.1038/28764)
- Helgason T, Fitter AH, Young JPW (1999) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising *Hyacinthoides non-scripta* (bluebell) in a seminatural woodland. *Molecular Ecology* 8: 659-666. DOI: [10.1046/j.1365-294x.1999.00604.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00604.x)
- Helgason T, Watson IJ, Young JPW (2003) Phylogeny of the *Glomerales* and *Diversisporales* (Fungi : *Glomeromycota*) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters* 229: 127-132.
- Hempel S, Renker C, Buscot F (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930-1938. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2007.01309.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01309.x)
- Hetrick BAD and Bloom J (1986) The influence of host plant on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia* 78: 32-36. DOI: <http://www.jstor.org/stable/3793373>
- Hibbett DS and Binder M (2001) Evolution of marine mushrooms. *The Biological Bulletin* 201: 319-322.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547. DOI: [10.1016/j.mycres.2007.03.004](https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004)
- Hijri I, Sýkorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Redecker D (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15: 2277-2289. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2006.02921.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02921.x)
- Hijri M and Sanders IR (2004) The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* 41: 253-261. DOI: [10.1016/j.fgb.2003.10.011](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2003.10.011)
- Hijri M and Sanders IR (2005) Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* 433: 160-163. DOI: [10.1038/nature03069](https://doi.org/10.1038/nature03069)
- Hodge A, Helgason T, Fitter AH (2010) Nutritional ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Ecology* 3: 267-273. DOI: [10.1016/j.funeco.2010.02.002](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.02.002)
- Hogberg MN and Hogberg P (2002) Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154: 791-795. DOI: [10.1046/j.1469-8137.2002.00417.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00417.x)
- Hohnjec N, Vieweg ME, Puhler A, Becker A, Kuster H (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* 137: 1283-1301. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.056572>
- Horner-Devine MC, Leibold MA, Smith VH, Bohannan BJM (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters* 6: 613-622. DOI: [10.1046/j.1461-0248.2003.00472.x](https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00472.x)
- Hosny M, Gianinazzi-Pearson V, Dulieu H (1998) Nuclear DNA content of 11 fungal species in *Glomales*. *Genome* 41: 422-428. DOI: [10.1139/g98-038](https://doi.org/10.1139/g98-038)
- Husband R, Herre EA, Turner SL, Gallery R, Young JPW (2002) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology* 11: 2669-2678. DOI: [10.1046/j.1365-294X.2002.01647.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01647.x)
- Jabaji-Hare S, Deschene A, Kendrick B (1984) Lipid-content and composition of vesicles of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycologia* 76: 1024-1030.
- Jabaji-Hare SH, Piché Y, Fortin JA (1986) Isolation and structural characterization of soil-borne auxiliary cells of *Gigaspora margarita* Becker and Hall, a vesicular-arbuscular mycorrhizal Fungus. *New Phytologist* 103: 777-784. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1986.tb00852.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1986.tb00852.x)
- James TY, Kauff F, Schoch C, et al. (2006) Reconstructing the early evolution of the fungi using a six gene phylogeny. *Nature* 443:818-822. DOI: [10.1038/nature05110](https://doi.org/10.1038/nature05110)
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2002a) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234. DOI: [10.1007/s00572-002-0163-z](https://doi.org/10.1007/s00572-002-0163-z)

- Jansa J, Mozafar A, Banke S, McDonald BA, Frossard E (2002b) Intra- and intersporal diversity of ITS rDNA sequences in *Glomus intraradices* assessed by cloning and sequencing, and by SSCP analysis. *Mycological Research* 106: 670-681. DOI: [10.1017/S0953756202006032](https://doi.org/10.1017/S0953756202006032)
- Jansa J, Mozafar A, Kuhn G, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2003) Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecological Applications* 13: 1164-1176. DOI: [http://dx.doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)13\[1164:STATCS\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1890/1051-0761(2003)13[1164:STATCS]2.0.CO;2)
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177: 779-789. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x)
- Jasper DA, Abbott LK, Robson AD (1989) Hyphae of a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus maintain infectivity in dry soil, except when the soil is disturbed. *New Phytologist* 112: 101-107. DOI: <http://www.jstor.org/stable/2556761>
- Javot H, Penmetsa RV, Terzaghi N, Cook DR, Harrison MJ (2007a) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 1720-1725. DOI: [10.1073/pnas.0608136104](https://doi.org/10.1073/pnas.0608136104)
- Javot H, Pumplin N, Harrison MJ (2007b) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell and Environment* 30: 310-322. DOI: [10.1111/j.1365-3040.2006.01617.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01617.x)
- Johnson D, Vandenkoornhuyse PJ, Leake JR, Gilbert L, Booth RE, Grime JP, Young JPW, Read DJ (2004) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New Phytologist* 161: 503-515. DOI: [10.1046/j.1469-8137.2003.00938.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00938.x)
- Johnson D, Anderson IC, Williams A, Whitlock R, Grime JP (2010) Plant genotypic diversity does not beget root-fungal species diversity. *Plant and Soil* 336: 107-111. DOI: <http://handle.uws.edu.au:8081/1959.7/510509>
- Johnson NC, Zak DR, Tilman D, Pfleger FL (1991) Dynamics of vesicular arbuscular mycorrhizae during old fields succession. *Oecologia* 86: 349-358. DOI: [10.1007/BF00317600](https://doi.org/10.1007/BF00317600)
- Keeling PJ and Fast NM (2002) *Microsporidia*: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* 56: 93-116. DOI: [10.1146/annurev.micro.56.012302.160854](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160854)
- Keeling PJ, Leander BS, Simpson A (2009) Eukaryotes. *Eukaryota*, Organisms with nucleated cells. Version 28 October 2009. <http://tolweb.org/Eukaryotes/3/20091028>. The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>
- Kerry BR (2000) Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38: 423-441. DOI: [10.1146/annurev.phyto.38.1.423](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.423)
- Kiers ET, Duhamel M, Beesetty Y, et al. (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333: 880-882. DOI: [10.1126/science.1208473](https://doi.org/10.1126/science.1208473)
- Kjølner R and Rosendahl S (2000) Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation polymorphism). *Plant and Soil* 226: 189-196. DOI: [10.1023/A:1026499923717](https://doi.org/10.1023/A:1026499923717)
- Klironomos JN, Hart MM, Gurney JE, Moutoglou P (2001) Interspecific differences in the tolerance of arbuscular mycorrhizal fungi to freezing and drying. *Canadian Journal of Botany* 79: 1161-1166. DOI: [10.1139/cjb-79-10-1161](https://doi.org/10.1139/cjb-79-10-1161)
- Klironomos JN and Hart MM (2002) Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. *Mycorrhiza* 12: 181-184. DOI: [10.1007/s00572-002-0169-6](https://doi.org/10.1007/s00572-002-0169-6)
- Koffi MC, de la Providencia IE, Elsen A, Declerck S (2009) Development of an in vitro culture system adapted to banana mycorrhization. *African Journal of Biotechnology* 8: 2750-2756. DOI: [10.5897/AJB2009.000-9309](https://doi.org/10.5897/AJB2009.000-9309)
- Kohout P, Sudova R, Janouskova M, Ctvrtlikova M, Hejda M, Pankova H, Slavikova R, Stajerova K, Vosatka M, Sýkorová Z (2014) Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry* 68: 482-493. DOI: [10.1016/j.soilbio.2013.08.027](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.027)
- Konopka A (2009) What is microbial community ecology? *The ISME Journal* 13: 1223-1230. DOI: [10.1038/ismej.2009.88](https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88)
- Kowalchuk GA and Stephen JR (2001) Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annual Review of Microbiology* 55: 485-529. DOI: [10.1146/annurev.micro.55.1.485](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.485)
- Krajinski F, Biela A, Schubert D, Gianinazzi-Pearson V, Kaldenhoff R, Franken P (2000) Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* 211: 85-90.
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schübler A (2009) DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212-223. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x)

- Kuhn G, Hijri M, Sanders IR (2001) Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 414: 745-748. DOI: [10.1038/414745a](https://doi.org/10.1038/414745a)
- Kula AAR, Hartnett DC, Wilson GWT (2005) Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant-herbivore interactions. *Ecology Letters* 8: 61-69. DOI: [10.1111/j.1461-0248.2004.00690.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00690.x)
- Latgé JP (2010) Tasting the fungal cell wall. *Cellular microbiology* 12(7): 863-872. DOI: [10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x)
- Leake JR, Johnson D, Donnelly DP, Muckle GE, Boddy L, Read DJ (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany* 82: 1016-1045. DOI: [10.1139/b04-060](https://doi.org/10.1139/b04-060)
- Lee J, Lee S, Young JPW (2008) Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *Fems Microbiology Ecology* 65: 339-349. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x)
- Lee J and Young JPW (2009) The mitochondrial genome sequence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* isolate 494 and implications for the phylogenetic placement of *Glomus*. *New Phytologist* 183: 200-211. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2009.02834.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02834.x)
- Lekberg Y, Koide RT, Rohr JR, Aldrich-Wolfe L, Morton JB (2007) Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 95: 95-105. DOI: [10.1111/j.1365-2745.2006.01193.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01193.x)
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7: 139-153. DOI: [10.1007/s005720050174](https://doi.org/10.1007/s005720050174)
- Li LF, Li T, Zhang Y, Zhao ZW (2010) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 418-427. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2009.00815.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00815.x)
- Li T, Hu Y-J, Hao Z-P, Li H, Wang Y-S, Chen B-D. 2013. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New phytologist* 197: 617–30. DOI: [10.1111/nph.12011](https://doi.org/10.1111/nph.12011).
- Li XL, Marschner H, George E (1991) Acquisition of phosphorus and copper by VA-mycorrhizal hyphae and root-to-shoot transport in white clover. *Plant and Soil* 136: 49-57. DOI: [10.1007/BF02465219](https://doi.org/10.1007/BF02465219)
- Lin K, Limpens E, Zhang Z, et al. (2014) Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus. *PLOS Genetic* 10(1): e1004078. DOI: [10.1371/journal.pgen.1004078](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004078)
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H (2012) Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north China revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science and Technology* 46: 5764-5771. DOI: [10.1021/es3001695](https://doi.org/10.1021/es3001695)
- Liu YJ, Hodson MC, Hall BD (2006) Loss of the flagellum happened only once in the fungal lineage: phylogenetic structure of Kingdom Fungi inferred from RNA polymerase II subunit genes. *BMC Evolutionary Biology* 6. DOI: [10.1186/1471-2148-6-74](https://doi.org/10.1186/1471-2148-6-74)
- Lopez-Pedrosa A, Gonzalez-Guerrero M, Valderas A, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2006) GintAMT1 encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 102-110. DOI: [10.1016/j.fgb.2005.10.005](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.10.005)
- Marschner H and Dell B (1994) Nutrient-uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* 159: 89-102. DOI: [10.1007/BF00000098](https://doi.org/10.1007/BF00000098)
- Martin F, Gianinazzi-Pearson V, Hijri M, Lammers P, Requena N, Sanders IR, Shachar-Hill Y, Shapiro H, Tuskan GA, Young JPW (2008) The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytologist* 180: 747-750. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2008.02671.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02671.x)
- Marzluf GA (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 17-32.
- Mathimaran N, Ruh R, Vullioud P, Frossard E, Jansa J (2005) *Glomus intraradices* dominates arbuscular mycorrhizal communities in a heavy textured agricultural soil. *Mycorrhiza* 16: 61-66. DOI: [10.1007/s00572-005-0014-9](https://doi.org/10.1007/s00572-005-0014-9)
- Mayr E (1942) Systematics and the origin of species. Columbia University Press, New York.
- McGonigle TP, Evans DG, Miller MH (1990) Effect of degree of soil disturbance on mycorrhizal colonization and phosphorus absorption by maize in growth chamber and field experiments. *New Phytologist* 116: 629-636. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X1999000700018>

- Merryweather J and Fitter A (1998) The arbuscular mycorrhizal fungi of Hyacinthoides non-scripta: I. Diversity of fungal taxa. *New Phytologist* 138:117–129. DOI: [10.1046/j.1469-8137.1998.00888.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00888.x)
- Miller RM, Reinhardt DR, Jastrow JD (1995) External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. *Oecologia* 103: 17-23. DOI: [10.1007/BF00328420](https://doi.org/10.1007/BF00328420)
- Mondo SJ, Toomer KH, Morton JB, Lekberg Y, Pawlowska TE (2012) Evolutionary stability in a 400-million-year-old heritable facultative mutualism. *Evolution* 66: 2564-2576. DOI: [10.1111/j.1558-5646.2012.01611.x](https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01611.x)
- Morton JB (1988) Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.
- Morton JB (1990) Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the *Endogonaceae*. *Mycologia* 82: 192-207. DOI: <http://www.jstor.org/stable/3759848>
- Morton JB and Benny GL (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): A new order *Glomales* and *Gigasporineae* and two new families *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae* with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon* 37: 471-491.
- Morton JB and Redecker D (2001a) Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195. DOI: <http://www.jstor.org/stable/3761615>
- Morton JB and Msiska Z (2009) Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of *Gigasporaceae* (*Glomeromycota*) into four families and five genera. *Mycorrhiza* 20: 483-496. DOI: [10.1007/s00572-010-0303-9](https://doi.org/10.1007/s00572-010-0303-9)
- Mummey DL and Rillig MC (2006) The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil* 288: 81-90. DOI: [10.1007/s11104-006-9091-6](https://doi.org/10.1007/s11104-006-9091-6)
- Naumann M, Schüßler A, Bonfante P (2010) The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the Mollicutes. *The ISME Journal* 4: 862-871. DOI: [10.1038/ismej.2010.21](https://doi.org/10.1038/ismej.2010.21)
- Newman EI and Reddell P (1987) The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist* 106: 745-751. DOI: <http://www.jstor.org/stable/4139076>
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816-2824. DOI: [10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003)
- Oehl F and Sieverding E (2004) *Pacispora*, a new vesicular arbuscular mycorrhizal fungal genus in the Glomeromycetes. *Journal of Applied Botany* 78: 72-82.
- Oehl F, Sieverding E, Mäder P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A (2004) Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583.
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris EA, Boller T, Wiemken A (2005) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist* 165: 273-283. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2004.01235.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01235.x)
- Oehl F, de Souza FA, Sieverding E (2008) Revision of *Scutellospora* and description of five new genera and three new families in the arbuscular mycorrhiza-forming Glomeromycetes. *Mycotaxon* 106: 311-360.
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bosch R, van der Heijden M, Sieverding E (2010) Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 724-738. DOI: [10.1016/j.soilbio.2010.01.006](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.01.006)
- Oehl F, da Silva GA, Goto BT, Maia LC, Sieverding E (2011a) *Glomeromycota*: two new classes and a new order. *Mycotaxon* 116: 365-379. DOI: <http://dx.doi.org/10.5248/116.365>
- Oehl F, da Silva GA, Goto BT, Sieverding E (2011b) *Glomeromycota*: three new genera and glomoid species reorganized. *Mycotaxon* 116: 75-120. DOI: [10.5248/116.75](https://doi.org/10.5248/116.75)
- Oehl F, da Silva GA, Sánchez-Castro I, Elísio H, Vieira E, Barea JM (2011e) Revision of Glomeromycetes with entrophosporoid and glomoid spore formation with three new genera. *Mycotaxon* 117:297-316. DOI: [10.5248/117.297](https://doi.org/10.5248/117.297)
- Oehl F, Sieverding E, Palenzuela J, Ineichen K, da Silva GA (2011d) Advances in *Glomeromycota* taxonomy and classification. *IMA Fungus* 2:191-199. DOI: [10.5598/imafungus.2011.02.02.10](https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.02.10)
- Oláh B, Brière C, Bécard G, Dénarié J, Gough C (2005). Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *The Plant*

- Journal* 44(2): 195-207. DOI: [10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02522.x)
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790. DOI: [10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x)
- Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, Zobel M, Moora M (2009) Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist* 184: 424-437. doi: [10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02920.x)
- Pawlowska T (2005) Genetic processes in arbuscular mycorrhizal fungi. Minireview. *FEMS Microbiology Letters* 251: 185-192
- Pawlowska T and Taylor JW (2004) Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 427: 733-737. DOI: [10.1038/nature02290](https://doi.org/10.1038/nature02290)
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougel C, van Tuinen D (2007) *Medicago* species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176: 197-210.
- Porras-Alfaro A, Herrera J, Natvig DO, Sinsabaugh RL (2007) Effect of long-term nitrogen fertilization on mycorrhizal fungi associated with a dominant grass in a semiarid grassland. *Plant and Soil* 296: 65-75. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2007.02151.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02151.x)
- Printzen C (2002) Fungal specific primers for PCR-amplification of mitochondrial LSU in lichens. *Molecular Ecology Notes* 2: 130-132. DOI: [10.1046/j.1471-8286.2002.00179.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00179.x)
- Purin S and Morton JB (2011) In situ analysis of anastomosis in representative genera of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 21: 505-514. DOI: [10.1007/s00572-010-0356-9](https://doi.org/10.1007/s00572-010-0356-9)
- Purin S and Morton JB (2013) Anastomosis behavior differs between asymbiotic and symbiotic hyphae of *Rhizophagus clarus*. *Mycologia* 105: 589-602. DOI: [10.3852/12-135](https://doi.org/10.3852/12-135)
- Raab P, Brennwald A, Redecker D (2005) Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of *Glomus* (arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomeromycota*). *Mycological Research* 109: 1315-1322. DOI: [10.1017/S0953756205003977](https://doi.org/10.1017/S0953756205003977)
- Redecker D, Thierfelder H, Walker C, Werner D (1997) Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order *Glomales*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1756-1761. DOI: <http://aem.asm.org/content/63/5/1756>
- Redecker D, Morton JB, Bruns TD (1999) Phylogeny and molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*). XVI International Botanical Congress, St. Louis, USA. DOI: [10.1023/A:1020283832275](https://doi.org/10.1023/A:1020283832275)
- Redecker D (2000) Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza* 10: 73-80. DOI: [10.1007/s005720000061](https://doi.org/10.1007/s005720000061)
- Redecker D, Hijri I, Wiemken A (2003) Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobotanica* 38: 113-124. DOI: [10.1007/s00572-013-0486-y](https://doi.org/10.1007/s00572-013-0486-y)
- Redecker D and Raab P (2006) Phylogeny of the *Glomeromycota* (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885-895.
- Redecker D, Raab P, Oehl F, Camacho FJ, Courtecuisse R (2007) A novel clade of sporocarp-forming species of glomeromycotan fungi in the *Diversisporales* lineage. *Mycological Progress* 6: 35-44.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stuermer SL, Morton JB, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23: 515-531.
- Renker C, Blanke V, Buscot F (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution* 135: 255-266. DOI: [10.1016/j.envpol.2004.11.002](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.11.002)
- Renne JJ, Rios BG, Fehmi JS, Tracy BF (2004) Low allelopathic potential of an invasive forage grass on native grassland plants: a cause for encouragement? *Basic and Applied Ecology* 5: 261-269. DOI: [10.1016/j.baee.2003.11.001](https://doi.org/10.1016/j.baee.2003.11.001)
- Rillig MC (2004) Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters* 7: 740-754. DOI: [10.1111/j.1461-0248.2004.00620.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00620.x)
- Robinson-Boyer L, Grzyb I, Jeffries P (2009) Shifting the balance from qualitative to quantitative analysis of arbuscular mycorrhizal communities in field soils. *Fungal Ecology* 2: 1-9. DOI: [10.1016/j.funeco.2008.11.001](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.11.001)
- Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 11: 3-11. DOI: [10.1101/gr.11.1.3](https://doi.org/10.1101/gr.11.1.3).
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* 242: 84-89. DOI: [10.1006/abio.1996.0432](https://doi.org/10.1006/abio.1996.0432)

- Rosendahl S and Matzen HB (2008) Genetic structure of arbuscular mycorrhizal populations in fallow and cultivated soils. *New Phytologist* 179: 1154-1161. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2008.02535.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02535.x)
- Rosendahl S, McGee P, Morton JB (2009) Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Molecular Ecology* 18: 4316-4329. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2009.04359.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04359.x)
- Salvioli A, Chiapello M, Fontaine J, Hadj-Sahraoui AL, Grandmougin-Ferjani A, Lanfranco L, Bonfante P (2010) *Endobacteria* affect the metabolic profile of their host *Gigaspora margarita*, an arbuscular mycorrhizal fungus. *Environmental Microbiology* 12: 2083-2095. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2010.02246.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02246.x)
- Sanchez-Castro I, Ferrol N, Cornejo P, Barea J-M (2012) Temporal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing roots of representative shrub species in a semi-arid Mediterranean ecosystem. *Mycorrhiza* 22: 449-460. DOI: [10.1007/s00572-011-0421-z](https://doi.org/10.1007/s00572-011-0421-z)
- Sanders IR, Alt M, Groppe K, Boller T, Wiemken A (1995) Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the *Glomales*: Application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* 130: 419-427. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1995.tb01836.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb01836.x)
- Sanders IR (1999) Evolutionary genetics - No sex please, we're fungi. *Nature* 399: 737-739. DOI: [10.1038/21544](https://doi.org/10.1038/21544)
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241-6246. DOI: [10.1073/pnas.1117018109](https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109)
- Schreiner RP and Bethlenfalvay GJ (1997) Mycorrhizae, biocides, and biocontrol .3. Effects of three different fungicides on developmental stages of three AM fungi. *Biology and Fertility of Soils* 24: 18-26.
- Schreiner RP, Mihara KL, McDaniel H, Bethlenfalvay GJ (1997) Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant and Soil* 188: 199-209. DOI: [10.1023/A:1004271525014](https://doi.org/10.1023/A:1004271525014)
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413-1421. DOI: [10.1017/S0953756201005196](https://doi.org/10.1017/S0953756201005196)
- Schüßler A and Walker C (2010) The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University. DOI: <http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/>
- Schützendübel A and Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53: 1351-1365. DOI: [10.1093/jexbot/53.372.1351](https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1351)
- Schwarzott D, Walker C, Schüßler A (2001) *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales), is nonmonophyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 190-197. DOI: [10.1006/mpev.2001.1007](https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1007)
- Sedzielewska KA, Fuchs J, Temsch E M, Baronian K, Watzke R, Kunze G (2011). Estimation of the *Glomus* intraradices nuclear DNA content. *New Phytologist* 192: 794-797. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2011.03937.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03937.x)
- Selosse MA and Le Tacon F (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends in Ecology and Evolution* 13: 15-20.
- Selosse MA, Bauer R, Moyersoen B (2002) Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytologist* 155: 183-195. DOI: <http://www.jstor.org/stable/1513894>
- Selosse MA, Setaro S, Glatard F, Richard F, Urcelay C, Weiss M (2007) Sebaciales are common mycorrhizal associates of Ericaceae. *New Phytologist* 174: 864-878. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02064.x)
- Simon L, Lalonde M, Bruns TD (1992) Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 291-295.
- Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69. DOI: [10.1038/363067a0](https://doi.org/10.1038/363067a0)
- Smith SE, Smith FA, Jakobsen I (2004) Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytologist* 162: 511-524. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2004.01039.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01039.x)
- Smith SE and Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press . 815pp.

- Smith SE, Facelli E, Pope S, Smith FA (2010) Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 326: 3-20.
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A (2009) 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 183: 1176-1187. DOI: <http://www.jstor.org/stable/40302144>
- Stockinger H, Krüger M, Schüßler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461-474. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x)
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Bouffaud ML, Koegel S, Redecker D (2014) The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLOS ONE* 9(10): e107783. doi: [10.1371/journal.pone.0107783](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107783)
- Stukenbrock EH and Rosendahl S (2005) Development and amplification of multiple co-dominant genetic markers from single spores of arbuscular mycorrhizal fungi by nested multiplex PCR. *Fungal Genetics and Biology* 42 (1): 73-80. DOI: [10.1016/j.fgb.2004.10.004](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.10.004)
- Stürmer SL (2012) A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza* 22: 247-258. DOI: [10.1007/s00572-012-0432-4](https://doi.org/10.1007/s00572-012-0432-4)
- Sýkorová Z, Ineichen K, Wiemken A, Redecker D (2007a) The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18: 1-14. DOI: [10.1007/s00572-007-0147-0](https://doi.org/10.1007/s00572-007-0147-0)
- Sýkorová Z, Wiemken A, Redecker D (2007b) Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5426-5434. DOI: [10.1128/AEM.00987-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00987-07)
- Tanabe Y, Saikawa M, Watanabe MM, Sugiyama J (2004) Molecular phylogeny of Zygomycota based on EF-1 alpha and RPB1 sequences: limitations and utility of alternative markers to rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 438-449. DOI: [10.1016/S1055-7903\(03\)00185-4](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00185-4)
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31: 21-32. DOI: [10.1006/fgbi.2000.1228](https://doi.org/10.1006/fgbi.2000.1228)
- Thaxter R (1922) A revision of the endogoneae. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 57: 289-351. DOI: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/20025921>
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, et al, (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 20117-20122. DOI: [10.1073/pnas.1313452110](https://doi.org/10.1073/pnas.1313452110)
- Tulasne LR and Tulasne C (1845) *Fungi nonnulli hypogaei, novi minus cogniti act.* *Nuovo Giornnale Botanico Italiano* 2: 35-63.
- Tullio M, Pierandrei F, Salerno A, Rea E (2003) Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhizae spores isolated from a cadmium-polluted and unpolluted soil. *Biology and Fertility of Soils* 37: 211-214. DOI: [10.1007/s00374-003-0580-y](https://doi.org/10.1007/s00374-003-0580-y)
- Turnau K, Ryszka P, Gianinazzi-Pearson V, van Tuinen D (2001) Identification of arbuscular mycorrhizal fungi in soils and roots of plants colonizing zinc wastes in southern Poland. *Mycorrhiza* 10: 169-174. DOI: [10.1007/s005720000073](https://doi.org/10.1007/s005720000073)
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglou P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72. DOI: [10.1038/23932](https://doi.org/10.1038/23932)
- van der Heijden MGA, Streitwolf-Engel R, Riedl R, Siegrist S, Neudecker A, Ineichen K, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (2006) The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist* 172: 739-752. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2006.01862.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01862.x)
- van Tuinen D, Jacquot E, Zhao B, Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V (1998) Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25 rDNA-targeted nested PCR. *Molecular Ecology* 7: 879-887. DOI: [10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00410.x)
- Vandenkoornhuyse P, Leyval C, Bonnin I (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal fungi: evidence for recombination events. *Heredity* 87: 243-253.
- Vandenkoornhuyse P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPW (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12: 3085-3095. DOI: [10.1046/j.1365-294X.2003.01967.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01967.x)

- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277: 494-499. DOI: [10.1126/science.277.5325.494](https://doi.org/10.1126/science.277.5325.494)
- Voets L, de la Providencia IE, Declerck S (2006) Glomeraceae and Gigasporaceae differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytologist* 172: 185-188. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2006.01873.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01873.x)
- von Wettstein F (1915) Geosiphon Fr. Wettst., eme neue interessante Siphonacee. *Österreichische botanische Zeitschrift* 65: 145-156.
- Wainright PO, Hinkle G, Sogin ML, Stickel SK (1993) Monophyletic Origins of the Metazoa an Evolutionary Link with Fungi. *Science* 260: 340-342. DOI: [10.1126/science.8469985](https://doi.org/10.1126/science.8469985)
- Walker C and Sanders IR (1986) Taxonomic concepts in the Endogonaceae: III. The separation of *Scutellospora* gen. nov. from *Gigaspora* Gerd. & Trappe. *Mycotaxon* 27: 169-182.
- Walker C and Schüßler A (2004) Nomenclatural clarifications and new taxa in the Glomeromycota. *Mycological Research* 108: 981-982. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756204231173>
- Walker C, Vestberg M, Demircik F, Stockinger H, Saito M, Sawaki H, Nishimura I, Schüßler A (2007) Molecular phylogeny and new taxa in the Archaeosporales (Glomeromycota): *Ambispora fennica* gen. sp nov, *Ambisporaceae* fam. nov, and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research* 111: 137-153. DOI: [10.1016/j.mycres.2006.11.008](https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.11.008)
- Wang B and Qiu Y (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 299-363. DOI: [10.1007/s00572-005-0033-6](https://doi.org/10.1007/s00572-005-0033-6)
- Waples RS and Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* 15: 1419-1439. DOI: [10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x)
- Watanarojanaporn N, Boonkerd N, Tittabutr P, Longtonglang A, Young JPW, Teaumroong N (2013) Effect of rice cultivation systems on indigenous arbuscular mycorrhizal fungal community structure. *Microbes and Environments* 28: 316-324.
- Weiss JV and Cozzarelli IM (2008) Biodegradation in contaminated aquifers: Incorporating microbial/molecular methods. *Groundwater* 46: 305-322. DOI: [10.1111/j.1745-6584.2007.00409.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-6584.2007.00409.x)
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press.
- Whittaker R (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163: 150-160. DOI: [10.1126/science.163.3863.150](https://doi.org/10.1126/science.163.3863.150)
- Wolfe BE, Husband BC, Klironomos JN (2005) Effects of a belowground mutualism on an aboveground mutualism. *Ecology Letters* 8: 218-223. DOI: [10.1111/j.1461-0248.2004.00716.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00716.x)
- Young JPW (2009) Kissing cousins: mycorrhizal fungi get together. *New Phytologist* 181: 751-753. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2009.02765.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02765.x)

Chapitre 2

Etude de l'impact de la fertilisation et de la perturbation du sol sur les structures, en symbiose, de la communauté de CMA et des populations de *Rhizophagus irregularis*.

Introduction au Chapitre 2

L'un des principaux enjeux de l'étude des CMA est l'utilisation de leurs services écosystémiques afin de diminuer les apports d'engrais azotés et phosphatés en agriculture durable. Ces sites sont soumis à de nombreuses pratiques culturales qui consistent classiquement en un labourage des parcelles suivi d'une fertilisation azotée et phosphatée. Or, il est bien accepté que les espèces de CMA et isolats puissent différer dans leurs caractéristiques propres (architecture hyphale, capacité de colonisation racinaire, efficacité de transfert des nutriments, etc.) aboutissant à des bénéfices variables pour leurs plantes hôtes. Les compétitions inter- et intra- spécifiques influencent nécessairement ces caractéristiques tout comme les pratiques culturales précédemment citées. C'est pourquoi, il est indispensable de comprendre l'établissement et le maintien de l'assemblage des communautés de CMA et de leurs populations dans ces milieux.

Les pratiques culturales intensives sont généralement reportées comme ayant un effet négatif sur l'abondance et/ou la diversité des CMA (Helgason *et al.*, 1998 ; Gosling *et al.*, 2006 ; Oehl *et al.*, 2003 ; Oehl *et al.*, 2004 ; Oehl *et al.*, 2005). Parmi les facteurs mis en cause ont été pointés notamment : le pH, le type de sol (Drumbell *et al.*, 2010) ou le type d'usage de sol (Öpik *et al.*, 2010). Ce dernier engendre, par le biais du labour, des changements de proportions d'espèces au sein des communautés de CMA (Stockinger *et al.*, sous presse, Annexe 1) ou influence l'établissement de populations chez l'espèce *Rhizophagus irregularis* (Börstler *et al.*, 2010). Les fertilisations (N et P) affectent, quant à elles, la colonisation racinaire des plantes (Mäder *et al.*, 2000 ; Blanke *et al.*, 2005 ; Santos *et al.*, 2006) ainsi que la composition des communautés de CMA (Toljander *et al.*, 2008).

C'est pourquoi, dans ce chapitre nous avons cherché à disséquer à court terme et au sein d'une bande enherbée, les effets séparés et conjoints, du retournement et de la fertilisation du sol (azotée et/ou phosphatée) sur la structure d'une part de la communauté des CMA; d'autre part des populations de l'espèce modèle *Rhizophagus irregularis*. Ainsi, des plantules pré-cultivées de *Plantago lanceolata* ont été transplantées dans des mini-parcelles expérimentales labourées et/ou fertilisées. Après trois mois de croissance aux champs, les racines de ces plantules ont été récupérées. Premièrement, la communauté des *Glomeromycota* présente dans les racines a été analysée par séquençage haut-débit d'un fragment du gène RPB1. Deuxièmement, afin d'appréhender la diversité intraspécifique de l'espèce *Rhizophagus irregularis*, nous avons utilisé la méthode RFLP sur les amplicons du gène marqueur mtLSU.

Mots clés : agriculture, Gloméromycètes, RFLP, séquençage haut-débit, RPB1, mtLSU.

Effects of short-term soil disturbance and fertilization on arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations in a grassland.

M. Peyret-Guzzon¹, H. Stockinger¹, ML Bouffaud¹ P. Farcy³, D. Wipf² and D. Redecker²

Running title: AMF communities under agricultural practices.

¹ INRA, UMR1347 Agroécologie, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065, Dijon Cedex, France.

² Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, 17 Rue Sully, BP 86510, 21065, Dijon Cedex, France.

³ Domaine Expérimental d'Epoisses, UE 0115 INRA Dijon, 21110 Bretenières, France.

Corresponding author : Dirk REDECKER

UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, 17 rue Sully, 21065 Dijon cedex, France

Phone +33 3 80 69 36 42, Fax +33 3 80 69 37 53

Submitted to FEMS microbiology Ecology

Abstract

We studied the separate and combined short-term effects of soil physical disturbance by ploughing and nitrogen and phosphate fertilization on the community structure of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and on the population structure of *Rhizophagus irregularis* in a grassland situated in a landscape dominated by arable fields. Pre-grown *Plantago lanceolata* plantlets were transplanted into fertilized and/or ploughed experimental plots. After three months, the glomeromycotan communities in the roots of these plants were analyzed using 454 pyrosequencing of a fragment of the RNA polymerase II gene (RPB1). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis based on the mitochondrial large ribosomal subunit gene (mtLSU) was used to study intraspecific populations of *Rhizophagus irregularis*. Soil disturbance significantly increased operational taxonomic unit (OTU) richness and altered relative abundances of different taxa levels (species, genera- or families), whereas fertilization had no clear-cut effects. At the population level, the expected shift from genotypes of *Rhizophagus irregularis* typically found in grasslands to those usually found in arable sites was partially observed. In conclusion, AMF community structure at both species and genotypes levels were affected by physical soil disturbance modulated by nitrogen fertilization.

Key words: *Glomeromycota*, tillage, next generation sequencing, RFLP, mtLSU, RPB1.

I. Introduction

Arbuscular Mycorrhiza (AM) are known to be instrumental for plant nutrition under a wide range of environmental conditions. The fungal symbionts of this mutualistic interaction occurring with the majority of land plants are placed in the phylum *Glomeromycota* and are able shown to transport mineral nutrients such as phosphate towards their plant hosts (Harrison *et al.*, 2002). Although host specificity is relatively low (Helgason *et al.*, 2002; Sykorová *et al.*, 2007b), specific interactions have been reported between pairs of plant and fungal symbionts (van der Heijden *et al.*, 1998; Scheublin *et al.*, 2007; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003) and a decisive influence of AM fungi on plant communities was demonstrated (van der Heijden *et al.*, 1998; van der Heijden *et al.*, 2003). For some glomeromycotan species, differences in the capacity to transport nutrients have been documented (Munkvold *et al.*, 2004; Jansa *et al.*, 2005; Jansa *et al.*, 2008).

Species-level diversity of *Glomeromycota* has been shown to be reduced in agricultural soils (Helgason *et al.*, 2002; Opik *et al.*, 2006). This was explained by the fact that only species of certain life history strategies may be able to persist under tillage, fertilization or fungicide treatments. The intensity of agricultural management seems to have a large influence on the community diversity of *Glomeromycota* (Oehl *et al.*, 2003). However, the influence of the abiotic factors involved has been only rarely studied separately.

Disturbance in the form of tillage seems to play a major role, as it necessitates continuous regrowth of the mycelial network (Verbruggen and Kiers, 2010) which, depending on the hyphal architecture of AM fungi, may differently affect glomeromycotan groups. Shifts in AM fungal communities in a long-term field experiment in Switzerland lead to the reduction of the family *Gigasporaceae*, and an unidentified *Glomeraceae* species-level molecular taxon (Stockinger *et al.*, in press). The ubiquitous model species *Rhizophagus irregularis* thrived most abundantly at intermediate tillage levels, whereas the known disturbance colonizer *Funnelformis mosseae* was dominant in the most intensively tilled plots. These results were largely in agreement with previous studies of Jansa and co-workers (Jansa *et al.*, 2002, Thonar *et al.* 2012). On the other hand, (Lekberg *et al.*, 2012) applied local disturbance to plots in a Danish coastal grassland and did not detect any modification on community structure. These authors attributed this fact to a high resilience of the mycorrhizal network.

With regard to the effects of fertilization, it is well established that fungal colonization levels are reduced in high-nutrient systems (Mäder *et al.*, 2000) and that long-term fertilization induces shifts in community composition (Toljander *et al.*, 2008). The latter may involve competitive exclusion with increased incidence of species having an r-type life history strategy, *i.e.* low investment in external mycelium and rapid spore production (Verbruggen *et al.*, 2010). Santos *et al.* (2006) analyzed AM fungal community composition along a nitrogen fertilization gradient using DGGE and SSU sequencing and found a less diverse community at high N levels but no straightforward qualitative effects.

The model fungus *Rhizophagus irregularis* is currently the only glomeromycotan species for which molecular markers allow the analysis of population structure in colonized roots in the field (Börstler *et al.*, 2008). This species has been reported to be ubiquitous, occurring in an extremely wide range of environments. Some of

this ubiquity may be due to ecotypes adapted to different sets of environmental conditions. For example, undisturbed low-nutrient grassland sites were shown to preferentially inhabit by a distinct set of mitochondrial large ribosomal subunit (mtLSU) genotypes of *Rhizophagus irregularis*, which are very rarely found in arable fields (Börstler *et al.*, 2010).

The goal of our study was to better understand the dynamics of i) AM fungal communities and ii) *Rhizophagus irregularis* populations both under the influence of tillage and nutrient fertilization, as well as in combinations of these factors. A field experiment manipulating these parameters was setup in grassland side strips in a landscape dominated by arable fields to identify relevant factors to community and population assembly. These side strips fulfil an important function as a diversity reservoir for plants and as possible refuges for the fauna (Vickery *et al.*, 2004) and have therefore been actively supported by the EU regulations since the Common Agricultural Policy (CAP) reform in 2003 (in France, the “Grenelle 2”, law n°2010-788). It could be hypothesized that they equally constitute reservoirs for AM fungal species and genotypes sensitive to agricultural practices.

The types of treatments may involve direct and plant-mediated effects. By disturbing and fertilizing the plots at the small scale, we left the opportunity open for intact hyphal networks to recolonize the test plants from surrounding host plants.

Disturbance has a direct impact on the fungal network by disrupting it, thereby interacting directly with fungal traits of mycelium architecture and the ability to restore hyphal connections. On the other hand, the space liberated by disturbance alters plant growth, which could again affect directly fungal symbionts. Fertilization is likely to have complex plant-mediated effects, as the community of symbiotic fungi may be altered when the plant down regulates its root colonization levels. This could lead to altered competition between the fungi or to preferential nutrient allocation to selected fungal species by the plant (Kiers and van der Heijden, 2006).

To analyze the AMF community level, we choose the gene RPB1 which was identified as a useful marker for phylogenetic analysis of fungi in addition to ribosomal gene regions (James *et al.*, 2006) and especially for *Glomeromycota* (Redecker and Raab, 2006). In addition, it was proposed as secondary DNA barcode for fungi (Schoch *et al.*, 2012). It has the advantage to be generally present as a single copy in the genome and primers with high specificity for *Glomeromycota* (>99 %) are available (Stockinger *et al.*, in press). For studying *Rhizophagus irregularis* populations, we used the, mtLSU gene, which is currently the sole marker gene allowing to genotype this species in colonized roots (Börstler *et al.*, 2008).

Our approach is unique in its concurrent analysis of two different levels of diversity (population and community). To our knowledge this is the first direct study of an experimental manipulation of a glomeromycotan population in the field. We hypothesized that the two levels of diversity are both impacted by the manipulations but that they may not respond to all factors in the same manner. We expected the grassland genotypes of *Rhizophagus irregularis* to be replaced by those typically occurring in arable lands.

II. Material and methods

A. Field site and experimental design

The study was conducted in a grassland strip on the experimental site of Epoisses, at Bretenières in the Burgundy region of France. Twenty-four plots (1.5m x 1.5m) were delimited within an area of 26m x 3.5m. This grassland strip was surrounded by arable lands in which no fertilization nor fungicide nor pesticide was applied. The soil of this strip has the following characteristics: pH (H₂O) 7.78, organic carbon content 34.9 g/kg, total nitrogen 2.68 g/kg, organic mater 60.3 g/kg phosphorus content (Olsen) 0.121 g/kg. The experimental set-up corresponded to a split plot design with disturbance as main design and four levels of fertilization within each soil disturbance assay is schematically represented in Figure 2.1a. Soil disturbance was generated in ploughing to a depth of 15 cm using a motor cultivator. Fertilization treatments consisted of local application of either nitrogen alone as NH₄NO₃ (+N, 100 kg/ha), phosphorus alone as triple superphosphate (+P, 30 kg/ha) or in combinations (+N+P), including a non-treated fertilized control (C). Each treatment was replicated three times. In each plot (Figure 2.1b), eight *Plantago lanceolata* plantlets, pre-grown under controlled conditions in a climate chamber during one month, were planted manually in four points (two plantlets by point), each at 50 cm inside the plot. *Plantago lanceolata* was chosen because it occurs naturally in the studied area and is known as an excellent host for AM.

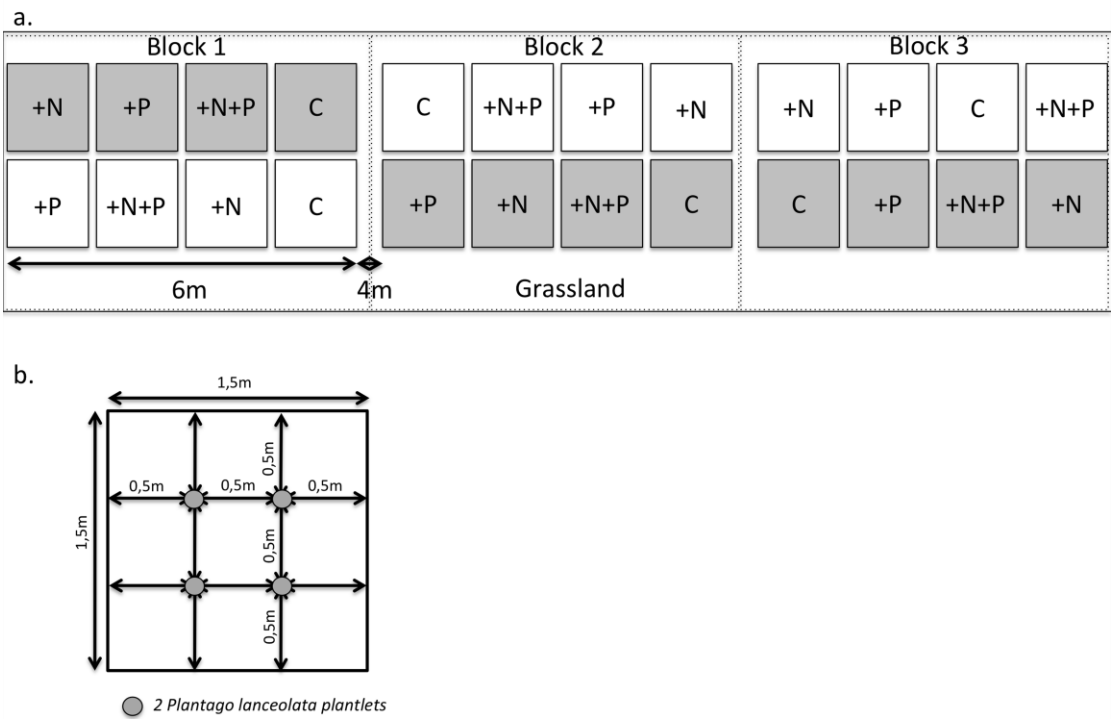


Figure 2.1: Schematic representation of the experimental set-up used at the experimental domain of Epoisses at Bretenières, Burgundy region, France. a. Overview of the experimental design: unploughed plots are shown in grey, ploughed plots in white. Fertilization treatments (+N: 100 kg/ha of nitrogen; +P: 30 kg/ha of phosphorus; +N+P: combined fertilization; C: no input) were randomly arranged within each strip of the ploughing treatment. b. Zoom on a plot showing planting pattern of *Plantago lanceolata*, pre-grown in a climate chamber during one month.

B. Harvest and DNA extraction

Three months after transplantation, all treatments were harvested in July 2012. Plants and rhizosphere soils were dug out, placed in plastic bags and stored at 4 °C. Shoots were dried and weighed. Roots were washed and weighed, then cut into one cm-pieces, which were thoroughly mixed within a sample. A small sub-sample was stained in Trypan blue for quantification of AM colonization using the method by Trouvelot *et al.* (1986). The remaining roots were frozen and kept at -80 °C for later DNA extraction.

Seventy milligrams of fresh roots were ground in 1.5 mL tube with pestle in liquid nitrogen and extracted according to manufacturer's protocol using a DNeasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA was eluted in 70 µl and 50 µl AE buffer and kept at -80 °C.

C. Amplification of the RPB1 gene and 454 pyrosequencing

Samples were prepared for 454 pyrosequencing in a two-step PCR procedure in order to amplify the RPB1 gene. A first PCR was performed using 0.02 U/µl Phusion polymerase (Thermo-Scientific, Illkirch, France), 1 µl genomic DNA, 1x Phusion HF Buffer, 0.5 µM of each primer (RPB1-HSm375-mix7 and RPB1-1210r, Stockinger *et al.*, in press) 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µg/µl BSA, 3 % DMSO in a total volume of 20 µl. Cycling parameters were: 30 s at 98 °C, 35 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 61 °C and 30 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C on an Eppendorf Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). Amplification success was checked on 1 % agarose gels. Each DNA extract was separately amplified three times. The three PCR products, with a size around 1100 bp, were pooled for each sample and purified using a High Pure PCR kit (Roche, Basel, Switzerland). Purified PCR products were diluted 1:10 in sterile filtered water (Eurobio, Courtaboeuf, France) and then used as template in the second step of the nested PCR.

In order to add the MID (a 10 bp barcode for post-sequencing sample identification), a short nested PCR was performed using 0.02 U/µl Phusion polymerase, 1 µl of diluted purified PCR product, 1 x Phusion HF Buffer, 0.5 µM of each primer (RPB1-DR160f+mix10 and RPB1-1210+MID), 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µg/µl BSA, 3 % DMSO in a total volume of 20 µl. Cycling parameters were 30 s at 98 °C, 10 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 64 °C, 30 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C. Again, PCR products were purified as described above. Final amplicons were quantified using the Quant-iT™ Picogreen® dsDNA Assay kit (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France) and mixed equimolarly in one library of 24 MIDs. 454-pyrosequencing was performed on a 1/4th plate by Beckman Coulter Genomics (Grenoble, France) on a 454 GS FLX Roche instrument. Raw data were submitted to the European Nucleotide Archive under the reference ID [accession numbers pending].

D. Reference database

The glomeromycotan classification used is the one proposed by Redecker *et al.* (2013). Three new sequences of *Scutellospora calospora* (LK985317-LK985319) were added to the 56 sequences already available in our reference database (Stockinger *et al.*, in press). Sequences were obtained from isolates of the "International

Bank of Glomeromycota" (IBG/BEG) located in Dijon (France), for details see Table 2.1 and Figure 2.2. DNA extraction of single or multiple spores was performed in 5 µl of 5 X GoTaq Flexi Buffer (Promega, Charbonnières, France). Amplifications were conducted as described in the previous paragraph and amplicons were sequenced by the Sanger method (GATC, Mulhouse, France). Sequences were edited using the Staden package 4 version 1.5 (Bonfield *et al.*, 1995) and aligned in ARB (Ludwig *et al.*, 2004). Phylogenetic relationships were inferred in RAXML using the Maximum likelihood method with bootstraps. The two species chosen as outgroups for the reference tree were *Mucor hiemalis* and *Mortierella verticillata*.

E. Sequence analyses and OTU determination

Raw data were mainly analyzed using the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) pipeline (Caporaso *et al.*, 2010b). Raw data were split by MID in the library. Primer and MID sequences were removed. Sequences were filtered by quality (25) and length thresholds (200 bp). Sequences having ambiguous bases were removed. Unaligned sequences at 60 % similarity with the reference alignment using PyNAST (Caporaso *et al.*, 2010a) were discarded. Sequences were clustered at 99.7 % similarity using USEARCH (Edgar, 2010) in order to perform a UCHIME *de novo* chimera search on clusters by barcode (Edgar *et al.*, 2011). MACSE (Ranwez *et al.*, 2011) was used to denoise sequences at the codon level. Using CROP (Hao *et al.*, 2011), an Operational Taxonomic Unit (OTU) search with a cut-off at 99.2 % sequence identity was performed (Stockinger *et al.*, in press). OTUs were assigned to a reference tree (Supplementary Figure 2.2), firstly in QIIME using the RDP naïve Bayesian Classifier method (Wang *et al.*, 2007); secondly the EPA algorithm of RAXML (Berger and Stamatakis, 2011) was used for confirmation. According to these phylogenetic assignments, OTUs were grouped in Molecular Taxa (MTs) at the species level. If the two phylogenetic assignments were not congruent, OTUs were assigned to a sublevel MT (genus or family). Before further analysis, singletons and non-glomeromycotan clusters were removed.

Table 2.1: Sequences used for the RPB1 reference tree. Bold characters refer to new sequences.

Phylum	Order	Family	Genus	Species	Country of origin	BEG n°	LPA n°	Other ID/strain	Accession n°	Sequence bibliographic record
Glomeromycota	Archaeosporales	Ambisporaceae	Ambispora	<i>Am. leptoticha</i>	Costa Rica			CR312	HG316014	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG316019	Stockinger <i>et al.</i> , in press
		Archaeosporaceae	Archaeospora	<i>Ar. trappei</i>	Costa Rica			CR401B	HG315988	Stockinger <i>et al.</i> , in press
		Geosiphonaceae	Geosiphon	<i>Ge. pyriformis</i>	Germany: Hessen				AM183921	James <i>et al.</i> , 2005
		Acaulosporaceae	Acaulospora	<i>Ac. laevis</i>	Spain	242	47		HG315978	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Ac. longula</i>	United Kingdom	8	46		HG315982	Stockinger <i>et al.</i> , in press
		Diversisporaceae	Diversispora	<i>Di. epigaea</i>	United States of America, Oregon	47	10		HG315975	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			Redeckera	<i>Re. fulva</i>	Martinique			Field sample CL/MART06.05	HG315981	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG315972	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG315970	Stockinger <i>et al.</i> , in press
		Gigasporaceae	Gigaspora	<i>Gi. candida</i>	Taiwan	17	52		HG315971	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Gi. gigantea</i>	North Carolina			NC199A	HG315998	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Gi. margarita</i>	New Zealand	34	2		EF014384	Liu <i>et al.</i> , 2006
				<i>Gi. rosea</i>	United States of America	9	23		HG316011	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			Cetraspora	<i>Ce. nodosa</i>	United Kingdom, Scotland	4	50		HG315979	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG315980	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG316013	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			Racocetra	<i>Ra. castanea</i>	France	1	4		HG315997	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Ra. cf. weresubiae</i>				trap culture	HG316003	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			Dentiscutata	<i>De. erythropus</i>	United States of America, Hawaii			HA150B	HG316016	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>De. heterogama</i>	United States of America	35	39		HG316017	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					United States of America, Florida			AFTOL-ID 138/FL225	HG316012	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			Scutellospora	<i>Scu. calospora</i>	United Kingdom, Scotland	32	49		DQ294604	James <i>et al.</i> , 2005
					Iceland	245	57		LK985317	This study
					Iceland	245	57		LK985318	This study
									LK985319	This study
	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomus	<i>Cl. claroideum</i>	Czech Republic	23	31		HG316018	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Cl. etunicatum</i>	Brazil	247	61		HG315991	Stockinger <i>et al.</i> , in press
		Glomeraceae	Funneliformis	<i>F. caledonius</i>	United Kingdom, England	20	12		JN985049	Stockinger <i>et al.</i> , 2011
				<i>F. coronatus</i>	Australia	22	13		JN985045	Stockinger <i>et al.</i> , 2011
				<i>F. geosporus</i>	United Kingdom, England	11	53		JN985048	Stockinger <i>et al.</i> , 2011
					Switzerland	18			AM284977	Redecker and Raab, 2006
									AM284978	Redecker and Raab, 2006
				<i>F. mosseae</i>	United Kingdom, England	12	5		JN985050	Stockinger <i>et al.</i> , 2011
					Germany	240	34		JN985046	Stockinger <i>et al.</i> , 2011
									JN985051	Stockinger <i>et al.</i> , 2011
									HG315973	Stockinger <i>et al.</i> , 2014
					China	246	58		JN985047	Stockinger <i>et al.</i> , 2011

S Table 2.1 suite: Sequences used for the RPB1 reference tree. Bold characters refer to new sequences.

Phylum	Order	Family	Genus	Species	Country of origin	BEG n°	LPA n°	Other ID/strain	Accession n°	Sequence bibliographic record
Glomeromycota	Glomerales	Glomeraceae	<i>Funneliformis</i>	<i>F. mosseae</i>	Germany			ISC813	AM284975	Redecker and Raab, 2006
					United States of America, Utah			AFTOL-ID 139/UT101	AM284976	Redecker and Raab, 2006
					United States of America, Florida			FL156	DQ294592	James and Vilgalys
				<i>Funneliformis. sp.</i>	Algeria			trap culture(AGc)	EF014383	Liu <i>et al.</i> , 2006
								trap culture(AGc)	HG315993	Stockinger <i>et al.</i> , in press
								trap culture(AGc)	HG315994	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			<i>Glomus</i>	<i>Gl. macrocarpum</i>	United Kingdom			Att1495-16	HG315995	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					United Kingdom			Att1519-0	HG316006	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Gl. sp. MES-190</i>	Chile			field sample/MES-190	HG316007	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG316021	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				Uncertain <i>Glomus</i>	<i>Gl. cf. diaphanum</i>	Brazil		BR608b-3	HG315968	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG315969	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			<i>Rhizophagus</i>	<i>Rh. clarus</i>	Brazil	142	16		HG315989	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					Brazil	248	64		HG316024	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					United States of America, West Virginia			WV235	HG316001	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Rh. intraradices</i>	United States of America, Florida			MUCL49413	HG316004	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Rh. irregularis</i>	France	141	8		HG316020	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					Russia	144	69		HG315987	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					United Kingdom	145			HG316008	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					Switzerland	158			HG315996	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					Italy	235	7		AM284973	Redecker and Raab, 2006
					Denmark	244	54		HG316009	Stockinger <i>et al.</i> , in press
								AFTOL-ID 845 /GINCO 4695ra c-11G2	HG316002	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									DQ294603	James and Vilgalys
					Canada		71	DAOM197198	AM284974	Redecker and Raab, 2006
									HG315983	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG315984	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					Austria			MB002	HG315992	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					Switzerland			JJ141	HG315999	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					Switzerland			JJ746	HG316000	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG316015	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Rh. proliferus</i>	Guadeloupe			DAOM226389	AM284979	Redecker and Raab, 2006
									AM284980	Redecker and Raab, 2006
									AM284981	Redecker and Raab, 2006
									AM284982	Redecker and Raab, 2006

Table 2.1 suite et fin: Sequences used for the RPB1 reference tree. Bold characters refer to new sequences.

Phylum	Order	Family	Genus	Species	Country of origin	BEG n°	LPA n°	Other ID/strain	Accession n°	Sequence bibliographic record
<i>Glomeromycota</i>	<i>Glomerales</i>	<i>Glomeraceae</i>	<i>Sclerocystis</i>	<i>Scl. cf. pubescens</i>	United Kingdom			environmental sample	HG316022	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					United Kingdom			environmental sample	HG316023	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Scl. sinuosa</i>	United States of America, Maryland			MD126	HG315990	Stockinger <i>et al.</i> , in press
			<i>Septoglomus</i>	<i>Se. deserticola</i>	United States of America	73	27		JN985044	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Se. viscosum</i>	Italy			U1	HG316005	Stockinger <i>et al.</i> , in press
	<i>Paraglomerales</i>	<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus</i>	<i>P. brasilianum</i>	United States of America	239	25		HG315974	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG315976	Stockinger <i>et al.</i> , in press
									HG315977	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>P. occultum</i>	United States of America, Iowa			AFTOL-ID 844/IA702	DQ294602	James and Vilgalys
					Colombia			CL700A	HG316010	Stockinger <i>et al.</i> , in press
				<i>Paraglomus sp.</i>	France, Lusignan			field sample	HG315985	Stockinger <i>et al.</i> , in press
					France, Lusignan			field sample	HG315986	Stockinger <i>et al.</i> , in press
<i>Mortierellomycotina</i>	<i>Mortierellales</i>	<i>Mortierellaceae</i>	<i>Mortierella</i>	<i>M. verticillata</i>				AFTOL-ID 141/NRRL6377	DQ294595	James and Vilgalys
<i>Mucoromycotina</i>	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>	<i>Mucor</i>	<i>M. hiemalis</i>				UW 221	EF014381	Liu <i>et al.</i> , 2006



Figure 2.2: Maximum likelihood tree of RPB1 sequences used as reference tree to assign operational taxonomic units to Molecular Taxa (MTs). Support values come from RAxML with 1,000 bootstrap replicates. *Mortierella verticillata* and *Mucor hiemalis* were used to root the tree.

F. Statistical analysis of pyrosequencing data

To determine whether sampling intensity was sufficient, OTU accumulation curves were generated using the QIIME pipeline. Prior to statistical analyses, the number of sequences reads per sample was standardized by OTU sub-sampling to a 1,400-sequence threshold, which was determined by OTU accumulation analysis. Representative OTU sequences were aligned in order to obtain a tree used in unweighted (based on phylogenetic structure) and weighted (based on phylogenetic structure and weighted by OTU abundances) UniFrac distance matrices (Lozupone and Knight, 2005), which were both visualized in Principal Coordinates Analyses (PCoAs) using QIIME. In addition, non-phylogenetic Bray-Curtis dissimilarity distance matrices were calculated based on OTU abundance, MT abundances at species, genus and family levels. Those matrices were visualized as ordination diagrams based by non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) using the vegan package (Oksanen *et al.*, 2013) in R software (R development core team, 2013).

Treatment effects (soil disturbance, nitrogen fertilization and phosphorus fertilization) as well as block effect (experimental design) on AMF community were statistically tested by Analysis of Similarity (ANOSIM) and nested permutation MANOVA with 2,000 permutations in QIIME based on Bray-Curtis distances among MTs. Alpha diversity was evaluated using the Shannon index per sample on abundance matrices. As the design was unbalanced, linear mixed models were performed, using nlme the package (Pinheiro *et al.*, 2014) of R software, to compare across treatments: mean Shannon diversity on species-level and genus-level MT abundances. Those models were randomized by block and effects of both nitrogen and phosphorus fertilizations were nested within disturbance treatment. Indicator species for treatments were identified using the indicpecies package of R software (De Caceres and Jansen, 2013) and only species with more than 100 sequences over the whole experiment and having both sensitivity and specificity values higher than 0.75 were kept.

G. Amplification of mtLSU and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

A first PCR was performed using 0.02 U/μl Phusion polymerase, 1 μl genomic DNA, 1 x Phusion HF Buffer, 0.5 μM of each primer (RNL-28a and RNL-5, Börstler *et al.*, 2008), 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 μg/μl BSA, 3 % DMSO in a total volume of 25 μl. Cycling parameters were: 30 s at 98 °C, 33 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 55 °C and 1 min 40 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C on an Eppendorf Mastercycler epgradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). Success of amplification was checked on 1 % agarose gels. Products of the first PCR were diluted 1:100 and used as templates for the second reaction using the primer pair RNL-29 and RNL-30 (Börstler *et al.*, 2008). 1 μl of diluted PCR product from the first reaction was used together with 0.02 U/μl Phusion polymerase, 1 x Phusion HF Buffer, 0.4 μM of each primer, 0.15 mM of dNTPs, 4 x BSA and 3 % DMSO in a volume of 50 μl. Cycling parameters were 30 s at 98 °C, 36 cycles of 10 s at 98 °C, 20 s at 60 °C and 1 min 40 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C.

Positive amplifications were cloned according to the Strataclone PCR Cloning Kit instructions (Agilent Technology, Courtaboeuf, France). At least 19 clones of each sample were re-amplified using the nested primers. These amplifications were digested using three different enzymes (*Bsa*II, *Dra*III, *Hind*III), according to the method described by (Börstler *et al.*, 2008). Digestion products were loaded on a 1.5 % gel (1 % agarose + 0.5 % NuSieve). The combined patterns of the three digestions defined a RFLP profile. Each RFLP profile was compared to a reference database of RFLP types (Börstler *et al.*, 2008; Börstler *et al.*, 2010) and assigned to known types. For RFLP profiles that were not yet present in the database, the respective amplicons were sequenced by Sanger sequencing (GATC, Mulhouse, France). Maximum likelihood phylogenetic trees were obtained using the RAXML software.

H. RFLP statistical analysis

Prior to analyses, clone number per sample was standardized by random sub-sampling to 19 clones, the lowest number of analyzed clones per sample. The vegan package of R was used to compare mtLSU RFLP type abundances by performing a nested mixed model, as described above in the community analysis part.

III. Results

A. Sequences, OTUs and Molecular Taxa (MTs)

A total of 51,106 reads were recovered after filtering and removal of chimeric sequences, which generated 62 OTUs overall at 99.2 % identity, ranging from 12 to 33 per sample. Based on OTU accumulation curve analysis, a sub-sampling to 1,400 sequences per sample (Figure 2.3b) was performed, as the curves indicated that the great majority of AMF OTUs was obtained using this threshold. Three samples were removed from analyses as their sequence numbers were too low. Hence, 21 samples at 1,400 sequences each were used for downstream analysis, with OTU numbers per sample ranging from ten to 30. The OTU assignment at the species level to the reference tree generated 25 Molecular Taxa (MTs, see Table 2.2), which belonged to eight genera, and five taxa at the genus level. Overall, representatives of five out of the eleven families of the phylum *Glomeromycota* were found. In each sample, *Glomerales* accounted for more than 85 % of sequence reads per sample. Often, one species in each genus was highly dominant (see Table 2.2).

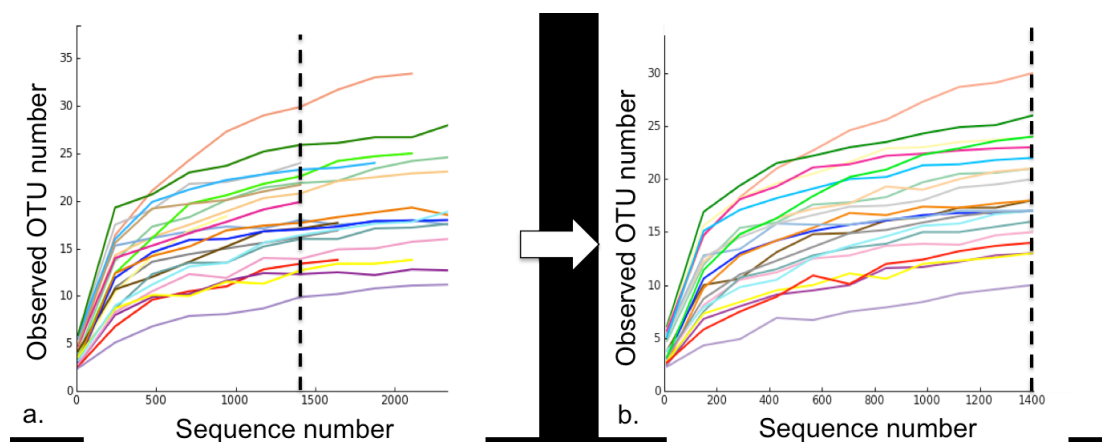


Figure 2.3: Accumulation curves analyses of observed OTU numbers versus cumulative sequence number by sample (colours) before (a) and after (b) sub-sampling to a 1,400 sequence threshold (dotted line).

Table 2.3: Results of the nested linear mixed model showing effects of nitrogen and phosphorus fertilization within disturbance treatments randomized by block.

	df	F-value	P-value
Disturbance	1	32.986	<0.001
Disturbance: Nitrogen fertilization	2	6.559	0.013
Disturbance: Phosphorus fertilization	2	0.066	0.936
Disturbance: Nitrogen fertilization: Phosphorus fertilization	2	0.339	0.719
		T-value	P-value
Disturbance		5.521	<0.001
Disturbed: Nitrogen fertilization		3.427	0.005
Undisturbed: Nitrogen fertilization		-1.101	0.294
Disturbed: Phosphorus fertilization		0.343	0.737
Undisturbed: Phosphorus fertilization		0.081	0.936
Disturbed: Nitrogen fertilization: Phosphorus fertilization		0.088	0.931
Undisturbed: Nitrogen fertilization: Phosphorus fertilization		-0.819	0.430

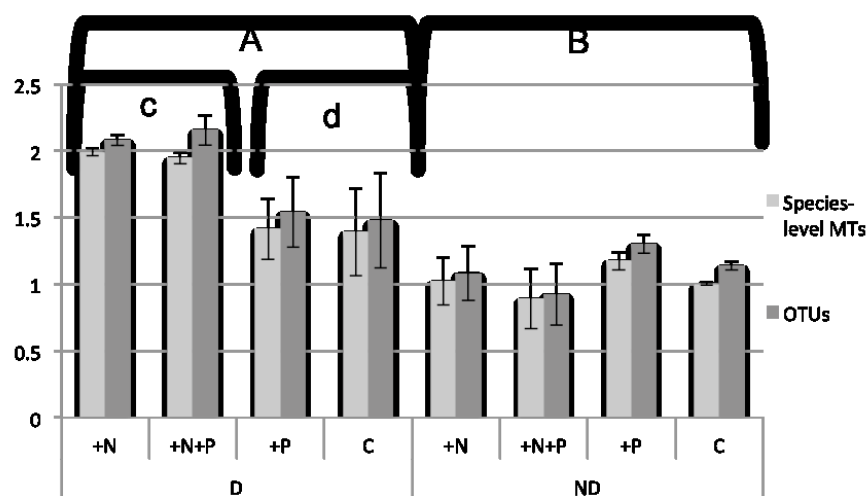


Figure 2.4: Mean Shannon index based on species MTs and OTUs respectively, across treatments of soil disturbance (ND: non disturbed and D: disturbed), and fertilization treatments within disturbance treatments (+N: nitrogen; +P: phosphorus; +N+P: nitrogen and phosphorus; C: no fertilization) according to nested mixed model analyses. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between treatments according to the nested linear mixed model randomized by block. Error bars represent standard error.

Table 2.2: Number of sequences found for species-level MT after sub-sampling to a threshold of 1,400 sequences. Numbers of OTUs found for each MT are in brackets.

			Soil disturbance treatments	Disturbed										Undisturbed										Total number of sequences per MT		
			Fertilization treatments	N input			N & P			P			None		N			N & P			P				None	
Order MT	Family MT	Genus MT	Species MT\block	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	3	1	2	3	1	2	1	2	3	2	3		
Archaeosporales	Archaeosporaceae	Archaeospora	Archaeospora sp.1 (1)	56	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	69	
Diversisporales	Diversisporaceae	Diversispora	Diversispora sp.1 (1)	0	0	3	1	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	10	
Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomus	Claroideoglomus sp. (1)	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	5
			Claroideoglomus sp.1 (3)	357	204	151	444	99	36	206	57	11	55	133	143	446	294	85	410	270	467	646	432	377		5323
			Claroideoglomus sp.2 (2)	0	48	0	42	24	33	0	0	0	6	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	164
			Claroideoglomus sp.3 (1)	18	12	0	0	0	15	17	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0	0	0	4	0	2	82
			Claroideoglomus sp.4 (2)	0	0	57	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	1	0	2	0	0	83
			Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis mosseae (4)	99	194	135	242	475	211	87	307	67	125	52	2	44	0	2	2	5	0	4	0	0
	Funneliformis sp.1 (1)	0			0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	Funneliformis sp.3 (4)	8			34	33	36	6	5	13	14	5	15	5	2	0	13	0	0	0	3	0	8	3		203
	Glomeraceae gp.1	Glomeraceae sp. (5)		0	0	0	0	0	0	0	0	5	4	0	0	1	0	0	0	6	0	0	0	0	0	16
		Glomeraceae gp.2		Glomeraceae sp.2 (2)	8	29	54	11	21	37	8	29	11	9	12	6	1	1	1	0	10	2	11	7	0	268
		Glomeraceae gp.3		Glomeraceae sp.3 (8)	3	5	6	2	4	25	23	8	4	4	7	3	86	0	3	17	3	5	32	4	3	247
	Glomeraceae gp.5	Glomeraceae sp.5 (2)		88	115	63	55	123	110	129	123	38	93	41	147	168	59	198	88	172	89	143	69	91		2202
		Glomeraceae gp.6		Glomeraceae sp.6 (1)	160	21	41	99	146	178	130	77	97	225	5	0	0	0	0	33	74	0	5	34		1325
		Glomus		Glomus sp.1 (1)	47	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0
	Glomus sp.2 (1)			0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis (9)		376	478	607	291	257	599	681	657	1089	698	1019	1077	620	987	1110	803	882	754	495	850	874		15204
	Septoglomus	Septoglomus sp.1 (2)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0		5
		Septoglomus sp.2 (1)		3	0	21	0	4	10	0	0	14	7	2	0	3	0	0	1	0	0	2	0	3		70
		Septoglomus sp.3 (1)		3	4	4	0	8	12	3	6	0	4	0	0	0	1	0	0	2	2	1	0	0		50
		Septoglomus viscosum like (3)	41	68	49	12	19	65	0	20	16	56	8	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0		358	
Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomus	Paraglomus sp.1 (2)	0	0	6	0	3	5	0	0	0	1	0	1	2	0	0	2	0	0	1	0	0	21	
			Paraglomus sp.2 (1)	133	178	168	151	147	54	102	101	43	73	102	19	29	31	1	62	15	3	47	19	12	1490	
			Paraglomus sp.3 (1)	0	9	2	2	27	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	61
Total number of sequences per sample				1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400	1400		

B. Diversity

Alpha diversity, expressed by the Shannon index, increased significantly in disturbed plots (F: 32.986; $P < 0.001$) and under nitrogen fertilization within the disturbance treatment (F: 6.559; $P: 0.013$), whereas no effect of phosphorus fertilization within disturbance treatments was found according to nested linear mixed model analysis (Figure 2.4, Table 2.3). An increase of *Plantago lanceolata* root and shoot biomass was found (F: 35.805 and F: 52.715, $P < 0.001$, respectively). Moreover, the increase of shoot biomass within disturbed plots was larger under nitrogen fertilization (F: 4.650; $P: 0.034$). *Plantago lanceolata* plantlets were unaffected in terms of mycorrhizal frequency or arbuscular abundance, by disturbance or fertilization treatments. On the contrary, a reduction of the intensity of mycorrhization was found both by disturbance (F: 11.729, $P: 0.005$) and within non-disturbed plots by phosphorus fertilization (F: 8.881, $P: 0.005$, data non shown).

C. Shifts in glomeromycotan community composition

In this study, PcoAs analyses of weighted/unweighted UniFrac, and Bray–Curtis dissimilarity based on OTUs or species MTs revealed similar patterns, therefore only the most informative analyses are presented here. The results of statistical analysis by nested permutational MANOVA (Table 2.4) show that soil disturbance (F: 0.364, $P: 0.001$) has a significant effect on AMF community composition and that nitrogen fertilization has a significant effect within the soil disturbance treatment (F: 0.194, $P: 0.022$).

A non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) ordination of AMF communities computed using a Bray-Curtis dissimilarity distance matrix of species-level MTs is presented in Figure 2.5. According to this analysis, the axis 1 (NMDS1) is segregating samples from disturbed and undisturbed plots (grey polygons). Both fresh root and dry shoot biomasses (blue arrows) were negatively correlated ($P < 0.05$) with the axis NMDS1 that segregated soil disturbance treatments. Abundance of *Rhizophagus irregularis* and *Claroideoglossum sp1*, respectively, was correlated with this axis, whereas *Funnelformis mosseae*, *Septoglossum viscosum*, *Glomeraceae sp2*, were negatively correlated with the same axis (species names in red italics in Figure 2.5).

Table 2.4: Results table of MANOVA with 2,000 permutations randomized by block based on Bray-Curtis species-level MTs distance matrix depending on the treatments: soil physical disturbance and fertilization treatments nested within soil disturbance treatment. Significant results are in bold type.

	df	R ²	P-value
Disturbance	1	0.364	0.001
Disturbance: Nitrogen fertilization	2	0.194	0.022
Disturbance: Phosphorus fertilization	2	0.045	0.620
Disturbance: Nitrogen fertilization: Phosphorus fertilization	2	0.008	0.984

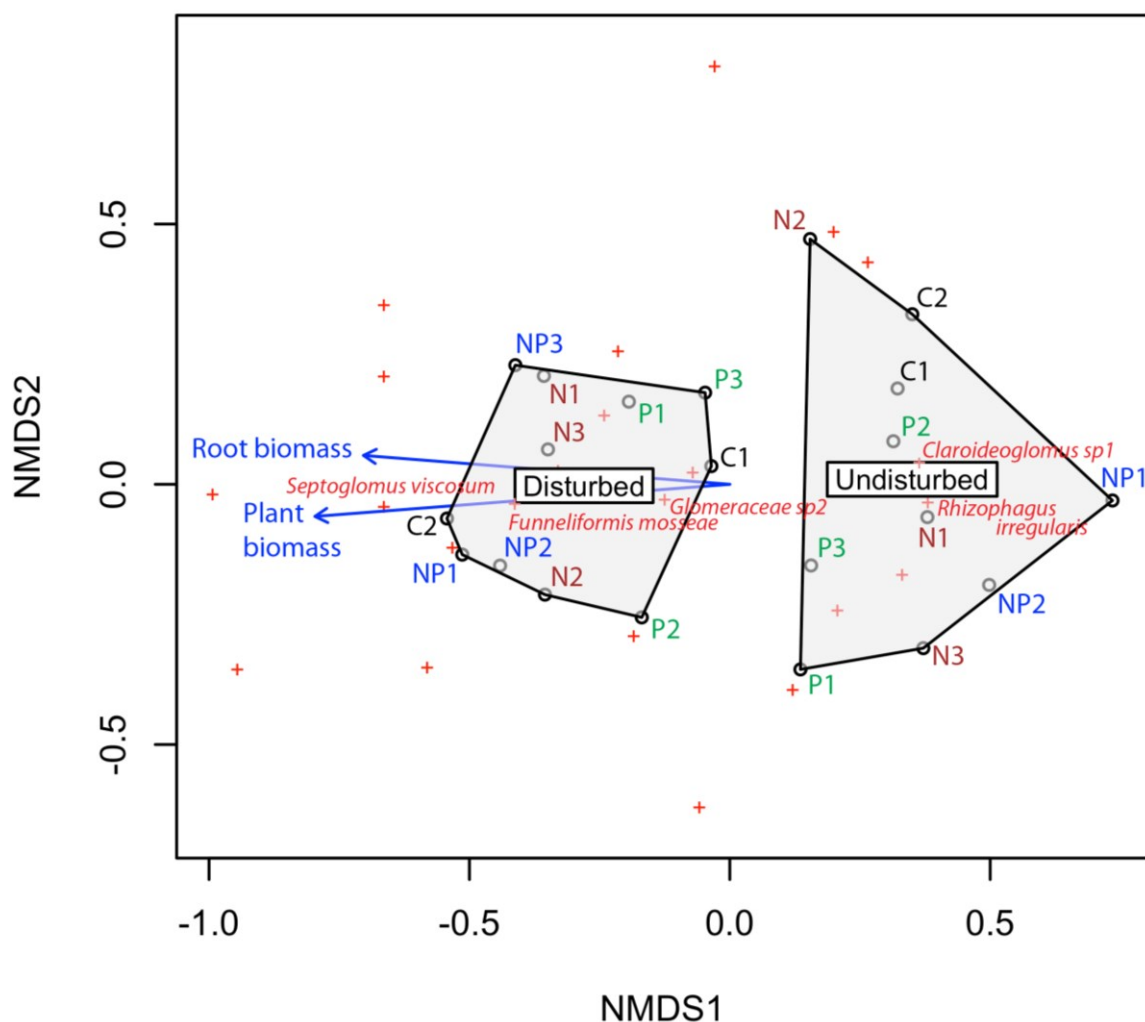


Figure 2.5: Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) ordination of AMF community composition computed using Bray-Curtis dissimilarity distance matrix on species-level MTs. Displayed by the two polygons are soil disturbance treatments (disturbed and undisturbed plots). Colours correspond to fertilization treatments: nitrogen fertilization (brown), phosphorus fertilization (green), nitrogen and phosphorus fertilization (blue) and no fertilization (black). Red crosses correspond to species vectors but only indicator species names are shown. Significant ($P < 0.05$) projected vectors are displayed by blue arrows.

Table 2.5: Results table of p-value indicator species analysis based on species-level MTs after sub-sampling to a threshold of 1,400 sequences. Only species with more than 100 sequences over the total read number and having both sensitivity and specificity values higher than 0.75 were kept.

Species	Disturbed plots
<i>Funneliformis mosseae</i>	<0.001
<i>Funneliformis sp.3</i>	<0.001
<i>Glomeraceae sp.6</i>	<0.001
<i>Septoglomus sp.3</i>	0.001
<i>Septoglomus viscosum</i>	0.025

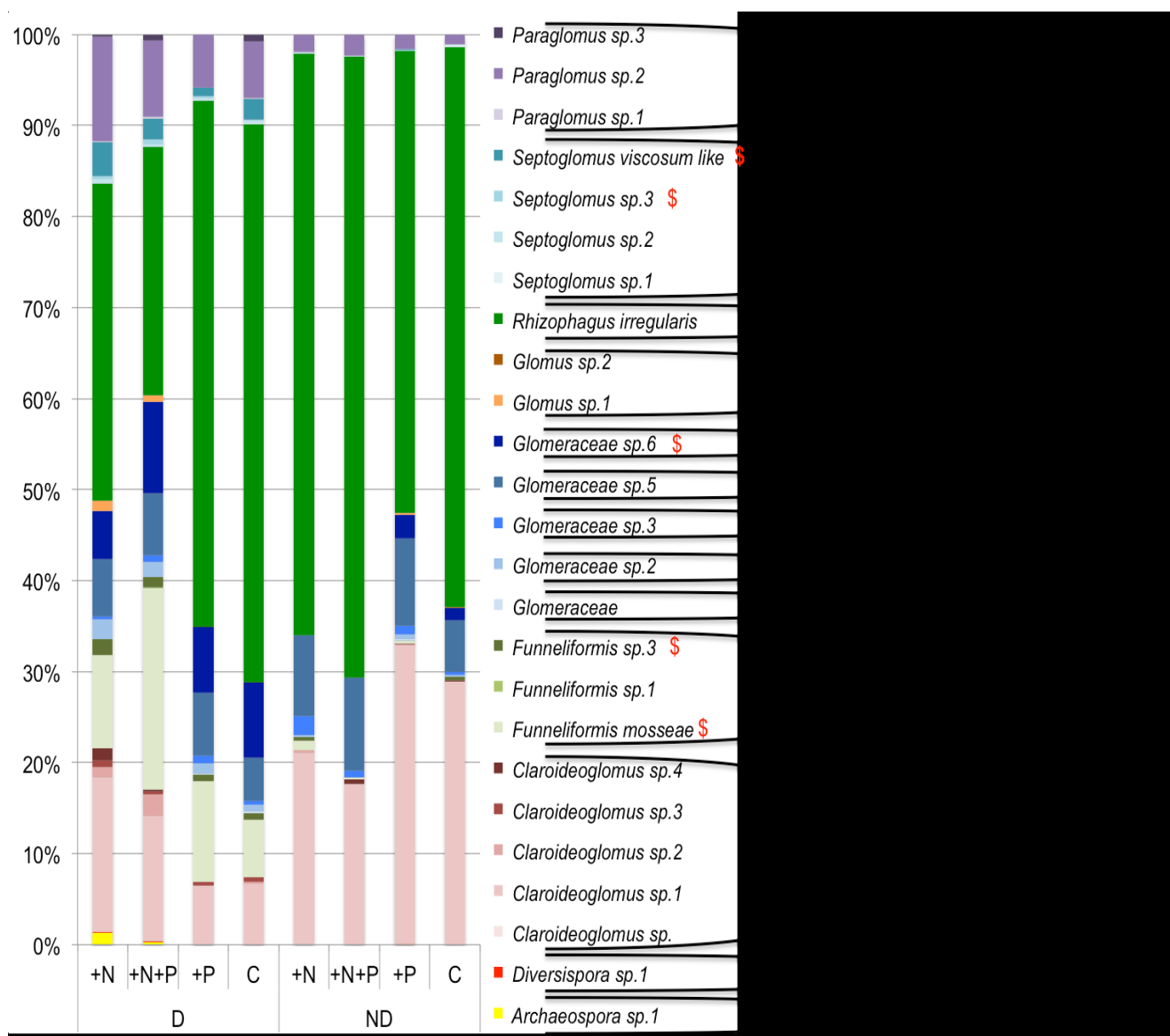


Figure 2.6: Mean relative abundance as percentage of the different species-, genus- and family-level MTs in the community after subsampling to a 1,400 sequence threshold across treatments of disturbance (ND: non-disturbed plots and D: disturbed plots) and fertilizations (+N: nitrogen; +P: phosphorus; +N+P: nitrogen and phosphorus; C: no input). Red dollar symbols show indicator species identified by the De Caeres-Jansen index with 2,000 permutations.

According to the p-values of the De Caeres-Jansen index after 2,000 iterations, several species were identified to be indicator species for soil disturbance (Table 2.5, Figure 2.6), i.e.: *Funneliformis mosseae*, *Funneliformis sp.3*, *Glomeraceae sp.6*, *Septoglomus sp.3* and *Septoglomus viscosum*, whereas no species was identified as an indicator of non-disturbance. Abundances of those species were different among soil disturbance treatments. In addition, an interaction effect of soil disturbance and nitrogen fertilization was found for *Rhizopagus irregularis*. The abundance of the species *Claroideoglossum sp.1* is reduced in soil disturbed plots within which abundance increased when nitrogen fertilization is applied. Abundance of *Paraglossum sp.2* is globally higher in disturbed plots and especially under nitrogen fertilization. The same tendencies were found at the genus level (data non shown).

Thus, soil disturbance is a strong factor influencing MT relative abundance (at genus and species levels), however, it seems to be largely modulated by fertilization treatments, especially by nitrogen fertilization. No spatial effect (block) was identified in any diversity analysis performed.

D. *Rhizopagus irregularis* population study

Overall, 24 different mtLSU RFLP profiles were detected. The corresponding sequences fall into the two intraspecific clades (Table 2.6) of genotypes typically found in arable fields and in grasslands, respectively (Börstler *et al.*, 2008), and a third more basal clade related to the isolate BEG 141. The RFLP profiles were classified into these three groups (Figure 2.7). In the three replicates of the non-disturbed and non-fertilized treatments, exclusively RFLP profiles corresponding to the “grassland clade” were found. The same was the case under N fertilization combines with disturbance. In the other treatments, at least half of all RFLP profiles were also of this type, in addition “arable field genotypes” were detected to varying extents in the remaining disturbed and/or fertilized treatments, mostly under disturbance and/or P fertilization. No clear distribution pattern was found for RFLP types corresponding to the BEG 141 clade. Overall, *Rhizopagus irregularis* mtLSU genotype distribution was relatively patchy with different replicates of the same treatment strongly varying.

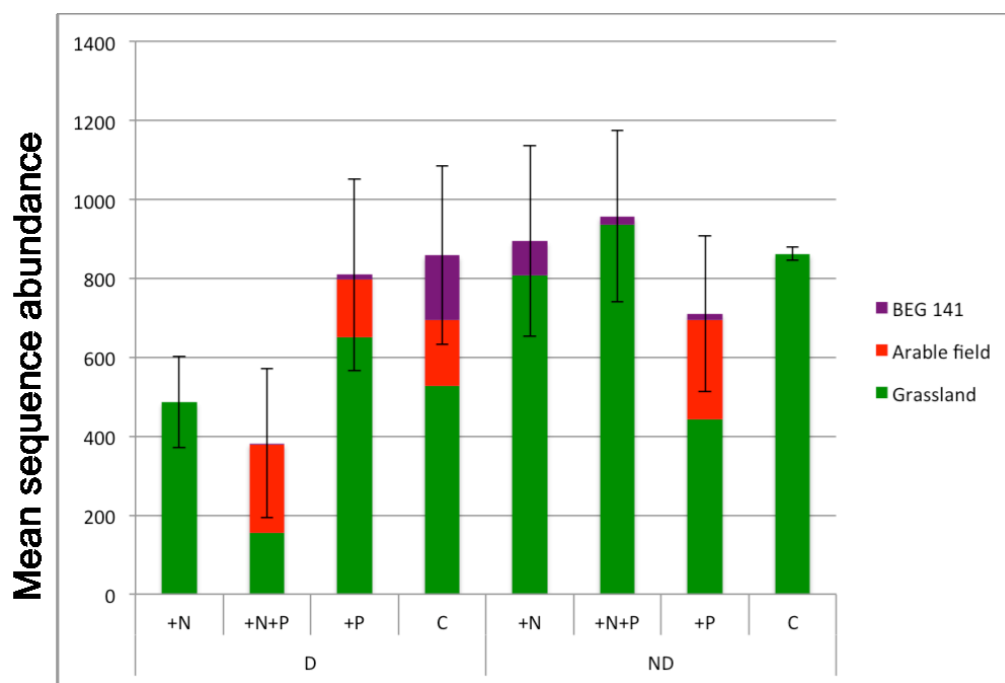


Figure 2.7: Combined diagram of the relative abundance of the species-level MT *Rhizopagus irregularis* (bar chart with standard deviation) and the three mtLSU genotype groups: BEG 141 group in purple; “arable genotypes” in red and “grassland genotypes” in green. MtLSU genotypes are shown in the proportions of the clones detected for each group, with relation to the species-level MT abundance in the respective treatment, set as 100 %. Soil disturbance treatments are ND: non-disturbed plots and D: disturbed plots. Fertilizations treatments are: +N: nitrogen; +P: phosphorus; +N+P: nitrogen and phosphorus; C: no fertilization.

Table 2.6: RFLP profile patterns (=RFLP types) of the mitochondrial rRNA subunit gene region from root-colonizing *Rhizophagus irregularis*, obtained using primers RNL-29/ RNL-30 and number of clones of each RFLP-type obtained in the respective treatments.

Population	RFLP type				Disturbed plots				Disturbed plots			
	RFLP type number	BsaI length	DraIII length	HindIII length	+Nitrogen	+Nitrogen +Phosphorus	+Phosphorus	Control	+Nitrogen	+Nitrogen +Phosphorus	+Phosphorus	Control
Grassland clade	6	107;541;907;1224	798; 1981	709;733;1337	3	6	2	18	38	17	18	17
	13	817;560;1926	817;1776	504;733;1356	49	1	11	1	0	3	19	2
	14	107;560;1187	817;1037	498;1356	1	0	1	0	0	16	0	19
	15	223;907;1225	373;1982	709;733;913	0	1	0	0	0	0	0	0
	27	87;560;2523	797;2373	185;504;1145;1336	3	17	18	1	11	1	0	0
Culture clade	60	107;553;1904	810;1754	196;308;733;1327	1	0	12	0	0	0	0	0
	2	203;438;1654	353;1942	198;508;585;1004	0	0	1	0	0	0	0	0
	3	238;438;883	388;1171	521;1038	0	17	9	0	0	0	0	0
	9	223;887	373;737	501;609	0	1	0	0	0	0	0	0
	24	203;2016	353;1866	198;508;585;928	0	12	0	0	0	0	19	0
	5a	106;448;829;1211	1127;1467	502;2092	0	0	0	0	0	0	0	0
	61	106;448;1212;1631	1468;1929	218;508;578;2093	0	0	1	9	0	0	0	0
	62	227;1971	370;1828	508;738;952	0	1	0	0	0	0	0	0
	63	223;1927	373;1777	504;733;913	0	0	1	0	0	0	0	0
BEG 141 clade	22	11;30;83;210;667;863	713;1151	477;1387	0	0	0	1	0	0	0	0
	25	11;30;83;210;667;2252	817;1151;1285	32;203;1387;1631	0	0	0	1	5	0	0	0
	64	11;30;103;210;667;1636	669;817;1171	1240;1407	0	0	0	0	0	0	1	0
	65	11;30;103;210;667;1691	1171;1541	218;509;578;1407	0	0	0	4	0	0	0	0
	66	111;557;879	736;811	493;1054	0	0	1	1	0	1	0	0
	67	107;562;1690	819;1540	218;508;578;1055	0	0	0	1	0	0	0	0
	68	11;30;103;210;667;1700	733;817;1171	219;1095;1407	0	0	0	1	0	0	0	0
	69	107;559;2244	818;2092	205;505;1054;1146	0	1	0	0	0	0	0	0
	70	27;52;80;107;126;564;972	821;1165	625;1361	0	0	0	0	2	0	0	0
	71	11;30;103;1181;2240	1475;2090	205;504;601;1110;1145	0	0	0	0	1	0	0	0

IV. Discussion

The goal of this study was to dissect the influence of short-term fertilization and soil disturbance on communities and populations of *Glomeromycota* in a grassland side strip in an environment strongly influenced by agriculture. These side strips may represent important reservoirs of biological diversity in agricultural landscapes. As AMF communities in arable soils are known to be mainly species-poor (Daniell *et al.*, 2001) compared to grasslands (Helgason *et al.*, 1998; Boddington and Dodd, 2000) it is useful to understand the transition between the two in order to be able to manage AMF functional diversity and thus optimize their ecosystem services in cultural landscapes.

In the present study, we revealed a strong effect of soil disturbance on AMF community composition and the effect of nitrogen fertilization within soil disturbed conditions. These findings are in agreement with previous studies revealing an influence of nitrogen fertilization on AMF community composition in long-term experiments both in agroecosystems (Avio *et al.*, 2013; Borriello *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012,) and in a semi-arid grassland (Porrás-Alfaro *et al.*, 2007). In addition, soil disturbance has previously been identified as a factor influencing AM fungal communities in natural plant communities (Husband *et al.*, 2002; Sykorová *et al.*, 2007b; Schnoor and Olsson, 2010) as well as in agrosystems in long-term experiments (Jansa *et al.*, 2002; Rosendahl, 2008; Borriello *et al.*, 2012; Stockinger *et al.*, in press). In contrast to our findings, in a recent study of a soil disturbance experiment over 4.5 months in a Danish coastal grassland (Lekberg *et al.*, 2012), no significant change in AMF communities was reported which the authors explained by the high resilience of local AMF communities. These authors also used *Plantago lanceolata* as a bait plant and 454 sequencing to analyze the AMF community. It is therefore possible that

AMF in our grassland situated in a cultural landscape may have had a lower resilience than in the coastal grassland, where tolerance to recurrent perturbation may well be a necessary adaptation. Other studies were conducted in agriculturally-used fields subjected to different tillage treatments and are therefore more difficult to compare, e.g. Stockinger *et al.* (in press, Annex 1), who detected significant shifts in AMF community composition according to the tillage treatments, or Borriello *et al.* (2012) who suggested that AMF communities are stronger structured by nitrogen fertilization than by soil disturbance.

In the disturbed plots, we detected a significant increase of AMF diversity as expressed by the Shannon index, which is somewhat surprising, because other studies have shown that agricultural practices and especially soil disturbance in the form of tillage negatively affect AMF OTU richness, e.g. in a two-year experiment in a grassland (Schnoor *et al.*, 2011). It seems possible that diversity increases initially after disturbance before decreasing in the long term. It would be therefore, in future studies, interesting to monitor this kind of system under repeated disturbance and long-term fertilization.

In this study, we presented shifts of AMF community composition and diversity at the short term driven by soil physical disturbance which present an even more intensive effect when coupled with nitrogen fertilization. A simultaneous effect on root and shoot biomasses of the studied plantlets was reported which could be considered as a confounding effect. However, soil disturbance affects abiotic properties of the soil like nutrient availability (Fraterrigo *et al.*, 2005) or soil moisture (Robertson *et al.*, 1993). It is also known to decrease species plant competition in grasslands (Wilson and Tilman, 1993), creating new patches for plant colonization (Grubb, 1977) and for competition for light (De Cauwer *et al.*, 2006), resulting in an increase of plant biodiversity (Schnoor and Olsson, 2010). As the grass cover was removed in our disturbed plots, this obviously allowed dormant components of the soil seed bank to establish and may have had an effect on AMF assemblages. Therefore, we assumed that observed effects on shoot and root biomasses are resulting from soil physical disturbance and fertilization treatments.

As high phosphorus fertilization levels have long been known to exert a negative effect on the AMF symbiosis, we were surprised to find that only one of the colonization parameters decreased under phosphorus fertilization within undisturbance treatment and that no effect on community composition was detected. In fact, previous findings pointing into the same direction (Smilauer, 2001; Jansa *et al.*, 2014) seem to indicate that the P effect on AMF communities is less important than previously thought. In any case, in contrast to disturbance, any fertilization effect in our experiment should be primarily mediated by the host plant, which can be expected to react to the fertilization levels and regulate mycorrhizal colonization accordingly. To further elucidate this, it would be necessary to repeat the experiment with different host plants.

A. AMF community shifts

Our samples were strongly dominated firstly by *Glomeraceae* with at least 45 % of sequences per sample, and a total number of 15 species-level MTs, followed by *Claroideoglomeraceae* (representing 7 % to 33 % of sequences per sample, with a total number of five MTs at species level). The dominance of *Glomeraceae* has been reported in numerous studies, whereas a dominance of these two families together was previously reported in grasslands (Dai *et al.*, 2013). Until recently, studies have paid little attention to the *Claroideoglomeraceae*, which was relatively recently split off from *Glomeraceae*, possibly because it was less prominent in many molecular studies due to mismatches with the frequently-used primer AM1 (Alguacil *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2013). What is notable is the almost complete absence of *Gigasporaceae* and *Acaulosporaceae*. However, those two families often have been described to be relatively rare in grasslands (Sykorová *et al.*, 2007a ; Dumbrell *et al.*, 2010), with few exceptions (Lin *et al.*, 2012). They have also been shown to have slow root colonization rates the *Gigasporaceae* form extensive mycelium in the soil rather than in roots (Hart and Reader, 2002).

Overall, few qualitative differences among the treatments were observed, as the increased depth of analysis of the high-throughput sequencing method, when compared to cloning/sequencing approaches, can be expected to render pronounced presence/absence patterns more unlikely. Primer biases have been shown to influence community patterns even using cloning/sequencing as reviewed (Hart and Reader, 2002). The use of pyrosequencing data as a semi-quantitative measure of taxon/OTU abundance has been demonstrated in some studies but has also been disputed (Amend *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2010; Kohout *et al.*, 2014). We nevertheless choose to carefully discuss some quantitative shifts of the proportional given taxon/OTU across treatments, for the following reasons: even if the inherent PCR biases leading to high or low sequence numbers are difficult to control, they are likely to remain the same across treatments, leaving sequence number as a valid working proxy of fungal abundance. Nevertheless, we would like to underline the necessity of true quantitative analysis such as qPCR to analyze Glomeromycotan communities, but this would require extensive knowledge of the taxa present to be able to design qPCR primers.

Among the shifts in community composition we observed, some were in accordance with previous studies, which were mostly long-term experiments, others concerned taxa that have never been studied before in this context. Soil disturbance causes hyphal network disruption, which favours species with r-type life history strategies, having large capacities to quickly sporulate and to colonize soil and roots, e.g. *Funneliformis mosseae* (Sykorová *et al.*, 2007a; Rosendahl, 2008). In our study, the abundance of the MT *Funneliformis mosseae* was indeed highly correlated with the soil disturbance treatment for which it was identified as indicator species. In this study, we show that the relative abundance of *Septoglomus* and especially the species *Septoglomus viscosum* increased significantly in disturbed plots and was identified as indicator species of soil disturbance. To our knowledge, no previous study has reported this effect. In some previous studies, *Paraglomus* was reported to be relatively rare in agricultural soils compared to pasture soil (Lumini *et al.*, 2010) and to increase with plant growth (Yu *et al.*, 2012). In spore-based studies, this genus was likely to be overlooked because of its small, colourless spores (Oehl *et al.*,

2003, Oehl *et al.*, 2005). In other studies, it might have been missed because of primer mismatches as suggested by Stockinger *et al.* (2009, 2010).

Interestingly, the genus *Paraglomus* seems to be more easily detected in soil than in roots (Hempel *et al.*, 2007; chapitre 2). It seems to be widespread in agricultural soils in England (Gosling *et al.*, 2014) where it responded to organic management and phosphorus fertilization. Dai *et al.* (2013) reported the genus *Paraglomus* to be a dominant OTU in the maritime ecozone of Canada and to be rare in grasslands. We observed that the genus *Paraglomus* (and especially the molecular species *Paraglomus* sp2) was significantly more frequent in disturbed plots. These results suggest that the distribution of this genus in agricultural systems and its response to environmental factors merit further study.

Our study shows a global decrease of the genus *Claroideoglomus* and *Claroideoglomus* sp1 upon soil disturbance, an effect that however appears to be reversed by nitrogen fertilization. This species was one of the most prominent species in terms of explaining the variability of the community composition of our sample. Interestingly, the shifts in relative abundance of the *Claroideoglomus* genus MT were opposite to those observed for the genus *Rhizophagus* (that is, *Rhizophagus irregularis*). One possible explanation would be that the members of these two genera act in a complementary fashion, as demonstrated between *Claroideoglomus claroideum* and *Rhizophagus irregularis* (Jansa *et al.*, 2008). As *Rhizophagus irregularis* has been frequently discussed as generalist (Sykоровá *et al.*, 2007a), this is somewhat surprising but has to be discussed with regard to the population structure of this species, which was analyzed for the first time in parallel in the present study.

B. Population structure of *Rhizophagus irregularis*

In the present study, about half of the mtLSU genotypes of *Rhizophagus irregularis* detected were new to science, indicating that intraspecific diversity will have to be further explored for some time before reaching a plateau. Genotypes typically found in grasslands have been distinguished from others characteristic of arable fields (Börstler *et al.*, 2008) in which it has not been clear which cultural practices are mainly responsible for the division between the two types of populations (arable fields vs. grassland) and what may trigger a transition between them. As intraspecific diversity in the *Glomeromycota* may account for quite some proportion of functional diversity (Leake *et al.*, 2004, Koch *et al.*, 2006; Angelard *et al.*, 2010), this phenomenon could be relevant for plant growth in agricultural systems. We therefore hypothesized that "arable" genotypes of *Rhizophagus irregularis* would replace the grassland types under agricultural practices. Contrary to this expectation, we only observed a partial shift from grassland to arable RFLP types in our experiment. Also, the experimental replicates showed strong heterogeneity in their population composition. This situation can be interpreted as a certain tolerance of grassland RFLP types to soil disturbance/fertilization, perhaps favoured by the fact that the experiment was relatively small-scaled and allowed ingrowth of mycelia from surrounding grasslands, but could also be a possible consequence of a low quantity of inoculum of "arable-type" *Rhizophagus irregularis* in the initial grassland, which may also partly explain the

surprising decrease of the species-level MT *Rhizophagus irregularis* in the disturbance treatments with nitrogen fertilization.

Conclusions

In conclusion, the study showed that physical soil disturbance and fertilization of a grassland side strip resulted, even within less than a season, in clear shifts in the structure of arbuscular mycorrhizal fungi communities. Soil disturbance was the dominant factor although it was clearly modulated by fertilization under these conditions. Changes in the population structure of *Rhizophagus irregularis* were less pronounced than expected. Future studies will have to show whether these effects are reversible and /or whether over longer periods of time they will result in the expected population structure consisting of "arable" genotypes of *Rhizophagus irregularis* and reduced species diversity. Our results will thus contribute to a better understanding of the dynamics of AMF communities and populations in agroecosystems.

Acknowledgements

This study was made possible by a grant of the Region Burgundy (FABER program n° 2010-9201AAO047S01404), which is gratefully acknowledged. We are grateful to Marie-Hélène Bernicaut, Philippe Chamois, Annie Colombet, Odile Chatagnier, Bernard Alixant, Eric Bernaud, Diederik van Tuinen, Romain Barnard, Aymé Spor and Nassybat Binti Said Ismail for their helpful participation in this experimentation and for their comments.

Conclusion du Chapitre 2

Au cours de cette étude, nous avons constaté qu'à court terme et même à très faible échelle, à l'échelle de mini-parcelles, les pratiques culturales entraînent des changements significatifs de la composition des communautés de CMA. Parmi ces pratiques culturales, il semble que le retournement du sol soit le facteur le plus structurant bien que fortement modulé par les fertilisations et en particulier la fertilisation azotée. Ainsi une augmentation notable de la diversité a été observée dans les parcelles labourées, en particulier celles fertilisées à l'azote. De plus, des changements de l'assemblage de la communauté de CMA ont été démontrés par des modifications significatives des abondances de certains genres et espèces et par l'identification d'espèces indicatrices des traitements expérimentaux appliqués.

Cependant, les effets des pratiques culturales étudiées ici, sont moins prononcés en ce qui concerne les populations de *Rhizophagus irregularis*. Au sein de l'espèce *Rhizophagus irregularis*, le remplacement attendu des génotypes typiquement retrouvés dans les prairies par ceux retrouvés classiquement dans les champs arables ne semble s'être opéré que partiellement.

Cette étude participe à la meilleure compréhension de la dynamique de l'établissement et du maintien non seulement des CMA mais aussi des populations de *Rhizophagus irregularis* dans les agrosystèmes ce qui soulève certains domaines d'investigations à explorer pour accroître cette compréhension.

Références bibliographiques du Chapitre 2

- Alguacil MM, Lumini E, Roldan A, Salinas-Garcia JR, Bonfante P, Bianciotto V (2008) The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecological Applications* 18: 527-536. DOI: 10.1890/07-0521.1
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19: 5555-5565. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04898.x
- Angelard C, Colard A, Niculita-Hirzel H, Croll D, Sanders IR (2010) Segregation in a mycorrhizal fungus alters rice growth and symbiosis-specific gene transcription. *Current Biology* 20: 1216-1221. DOI: 10.1016/j.cub.2010.05.031
- Avio L, Castaldini M, Fabiani A, Bedini S, Sbrana C, Turrini A, Giovannetti M (2013) Impact of nitrogen fertilisation and soil tillage on arbuscular mycorrhizal fungal communities in a Mediterranean agroecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 67: 285-294. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.09.005
- Berger SA, Stamatakis A (2011) Aligning short reads to reference alignments and trees. *Bioinformatics* 27: 2068-2075. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr320
- Blanke V, Renker C, Wagner M, Fullner K, Held M, Kuhn AJ, Buscot F (2005) Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonisation of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. *New Phytologist* 166: 981-992. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01374.x
- Boddington CL, Dodd JC (2000) The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. II. Studies in experimental microcosms. *Plant and Soil* 218: 145-157. DOI: 10.1023/A:1014911318284
- Bonfield JK, Smith KF, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research* 23: 4992-4999. DOI: 10.1093/nar/23.24.4992
- Borriello R, Lumini E, Girlanda M, Bonfante P, Bianciotto V (2012) Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biology and Fertility of Soils* 48: 911-922. DOI: 10.1007/s00374-012-0683-4
- Börstler B, Raab PA, Thiéry O, Morton JB, Redecker D (2008) Genetic diversity of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as determined by mitochondrial large subunit rRNA gene sequences is considerably higher than previously expected. *New Phytologist* 180: 452-465. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02574.x
- Börstler B, Thiéry O, Sýkorová Z, Berner A, Redecker D (2010) Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497-1511. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04590.x
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, DeSantis TZ, Andersen GL, Knight R (2010a) PyNASt: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26: 266-267. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp636
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335-336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303
- Croll D, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, Sanders IR (2008) Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 181: 924-937. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02726.x
- Dai M, Bainard LD, Hamel C, Gan Y, Lynch D (2013) Impact of land use on arbuscular mycorrhizal fungal communities in rural Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 6719-6729. DOI: 10.1128/AEM.01333-13
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203-209. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00841.x
- De Caceres M, Legendre P (2009) Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, URL <http://sites.google.com/site/miqueldecaceres/>.
- De Cauwer B, Reheul D, D'Hooghe K, Nijs I, Milbau A (2006) Disturbance effects on early succession of field margins along the shaded and unshaded side of a tree lane. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112: 78-86. DOI: 10.1016/j.agee.2005.07.006
- Dumbrell AJ, Nelson M, Helgason T, Dytham C, Fitter AH (2010) Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal* 4: 325-337. DOI: 10.1038/ismej.2010.48

- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381
- Fraterrigo JM, Turner MG, Pearson SM, Dixon P (2005) Effects of past land use on spatial heterogeneity of soil nutrients in southern appalachian forests. *Ecological Monographs* 75: 215-230. DOI: 10.1890/03-0475
- Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 113: 17-35. DOI: 10.1016/j.agee.2005.09.009
- Gosling P, Proctor M, Jones J, Bending GD (2014) Distribution and diversity of *Paraglomus* spp. in tilled agricultural soils. *Mycorrhiza* 24: 1-11. DOI: 10.1007/s00572-013-0505-z
- Grubb PJ (1977) Maintenance of species-richness in plant communities - importance of regeneration niche. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 52: 107-145. DOI: 10.1111/j.1469-185X.1977.tb01347.x
- Hao XL, Jiang R, Chen T (2011) Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 27: 611-618. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq725
- Harris JK, Sahl JW, Castoe TA, Wagner BD, Pollock DD, Spear JR (2010) Comparison of normalization methods for construction of large, multiplex amplicon pools for next-generation sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3863-3868. DOI: 10.1128/AEM.02585-09
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429. DOI: 10.1105/tpc.004861
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335-344. DOI: 10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431. DOI: 10.1038/28764
- Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH (2002) Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371-384. DOI: 10.1046/j.1365-2745.2001.00674.x
- Hempel S, Renker C, Buscot F (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930-1938. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01309.x
- Husband R, Herre EA, Turner SL, Gallery R, Young JPW (2002) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology* 11: 2669-2678. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01647.x
- James TY, Kauff F, Schoch CL et al. (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-824. DOI: 10.1038/nature05110
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234. DOI: 10.1007/s005572-002-0163-z
- Jansa J, Mozafar A, Frossard E (2005) Phosphorus acquisition strategies within arbuscular mycorrhizal fungal community of a single field site. *Plant and Soil* 276: 163-176. DOI: 10.1007/s11104-005-4274-0
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177: 779-789. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x
- Jansa J, Erb A, Oberholzer HS, Smilauer P, Egli S (2014) Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Molecular Ecology* 23: 2118-2135. DOI: 10.1111/mec.12706
- Kiers ET, van der Heijden MGA (2006) Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: Exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology* 87: 1627-1636. DOI: 10.1890/0012-9658(2006)87[1627:MSITAM]2.0.CO;2
- Koch AM, Kuhn G, Fontanillas P, Fumagalli L, Goudet J, Sanders IR (2004) High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungal. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2369-2371. DOI: 10.1073/pnas.0306441101

- Koch AM, Croll D, Sanders IR (2006) Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology Letter* 9: 103-110. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00853.x
- Kohout P, Sudova R, Janouskova M, Ctvrtlikova M, Hejda M, Pankova H, Slavikova R, Stajerova K, Vosatka M, Sýkorová Z (2014) Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biological Biochemistry* 68: 482-493. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.08.027
- Leake JR, Johnson D, Donnelly DP, Muckle GE, Boddy L, Read DJ (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of botany* 82: 1016-1045. DOI: 10.1139/B04-060
- Lekberg Y, Schnoor T, Kjoller R, Gibbons SM, Hansen LH, Al-Soud WA, Sorensen SJ, Rosendahl S (2012) 454-sequencing reveals stochastic local reassembly and high disturbance tolerance within arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 100: 151-160. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2011.01894.x
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H (2012) Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north China revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science and Technology* 46: 5764-5771. xoi: 10.1021/es3001695
- Lozupone C, Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8228-8235. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Ressources* 32: 1363-1371. DOI: 10.1093/nar/gkh293
- Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, Bonfante P, Bianciotto V (2010) Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology* 12: 2165-2179. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02099.x
- Mäder P, Edenhofer S, Boller T, Wiemken A, Niggli U (2000) Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biology and Fertility of Soils* 31: 150-156. DOI: 10.1007/s003740050638
- Munkvold L, Kjoller R, Vestberg M, Rosendahl S, Jakobsen I (2004) High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 164: 357-364. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01169.x
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816-2824. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003
- Oehl F, Sieverding E, Mäder P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A (2004) Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583. DOI: 10.1007/s00442-003-1458-2
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris EA, Boller T, Wiemken A (2005) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytologist* 165: 273-283. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01235.x
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bosch R, van der Heijden M, Sieverding E (2010) Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 724-738. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.01.006
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2013) vegan: community ecology package. R package version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x
- Porras-Alfaro A, Herrera J, Natvig DO, Sinsabaugh RL (2007) Effect of long-term nitrogen fertilization on mycorrhizal fungi associated with a dominant grass in a semiarid grassland. *Plant and Soil* 296: 65-75. DOI: 10.1007/s11104-007-9290-9
- R development core team (2013) R: a language and environment for statistical computing. *R foundation for statistical computing, Vienna, Austria*. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Ranwez V, Harispe S, Delsuc F, Douzery EJP (2011) MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons. *PLOS ONE* 6(9): e22594. DOI: 10.1371/journal.pone.0022594

- Redecker D, Raab P (2006) Phylogeny of the *Glomeromycota* (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885-895. DOI: 10.3852/mycologia.98.6.885
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stuermer SL, Morton JB, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23: 515-531. DOI: 10.1007/s00572-013-0486-y
- Robertson GP, Crum JR, Ellis BG (1993) The spatial variability of soil resources following long-term disturbance. *Oecologia* 96: 451-456. DOI: 10.1007/BF00320501
- Rosendahl S (2008) Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178: 253-266. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02378.x
- Santos JC, Finlay RD, Tehler A (2006) Molecular analysis of arbuscular mycorrhizal fungi colonising a semi-natural grassland along a fertilisation gradient. *New Phytologist* 172: 159-168. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01799.x
- Scheublin TR, van Logtestijn RSP, van der Heijden MGA (2007) Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *Journal of Ecology* 95: 631-638. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2007.01244.x
- Schnoor TK, Olsson PA (2010) Effects of soil disturbance on plant diversity of calcareous grasslands. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 139: 714-719. DOI: 10.1016/j.agee.2010.10.018
- Schnoor TK, Lekberg Y, Rosendahl S, Olsson PA (2011) Mechanical soil disturbance as a determinant of arbuscular mycorrhizal fungal communities in semi-natural grassland. *Mycorrhiza* 21: 211-220. DOI: 10.1007/s00572-010-0325-3
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 6241-6246. DOI: 10.1073/pnas.1117018109
- Smilauer P (2001) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland: Seasonal variability and effects of environment and host plants. *Folia Geobotanica* 36: 243-263. DOI: 10.1007/BF02803179
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A (2009) '*Glomus intraradices* DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 183: 1176-1187. <http://www.jstor.org/stable/40302144>
- Stockinger H, Krüger M, Schüßler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461-474. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Bouffaud ML, Koegel S, Redecker D (2014) The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLOS ONE* 9(10): e107783. DOI: 10.1371/journal.pone.0107783
- Sýkorová Z, Ineichen K, Wiemken A, Redecker D (2007a) The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18: 1-14. DOI: 10.1007/s00572-007-0147-0
- Sýkorová Z, Wiemken A, Redecker D (2007b) Cooccurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5426-5434. DOI: 10.1128/AEM.00987-07
- Thonar C, Erb A, Jansa J (2012) Real-time PCR to quantify composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities--marker design, verification, calibration and field validation. *Molecular Ecology Resources* 12: 219-232. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03086.x
- Toljander JF, Santos-Gonzalez JC, Tehler A, Finlay RD (2008) Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria in the maize mycorrhizosphere in a long-term fertilization trial. *FEMS Microbiology Ecology* 65: 323-338. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00512.x
- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. *Proceeding of the 1st European Symposium on Mycorrhizae*. INRA, Paris, pp 217-221.
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72. DOI: 10.1038/23932

- Van der Heijden MGA, Wiemken A, Sanders IR (2003) Different arbuscular mycorrhizal fungi alter coexistence and resource distribution between co-occurring plant. *New Phytologist* 157: 569-578. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00688.x
- van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letter* 11: 296-310. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x
- Vandenkoornhuyse P, Ridgway KP, Watson IJ, Fitter AH, Young JPM (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology* 12: 3085-3095. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2003.01967.x
- Verbruggen E, Kiers ET (2010) Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evolutionary Applications* 3: 547-560. DOI: 10.1111/j.1752-4571.2010.00145.x
- Verbruggen E, Roling WFM, Gamper HA, Kowalchuk GA, Verhoef HA, van der Heijden MGA (2010) Positive effects of organic farming on below-ground mutualists: large-scale comparison of mycorrhizal fungal communities in agricultural soils. *New Phytologist* 186: 968-979. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03230.x
- Vickery JA, Bradbury RB, Henderson IG, Eaton MA, Grice PV (2004) The role of agri-environment schemes and farm management practices in reversing the decline of farmland birds in England. *Biological Conservation* 119: 19-39. DOI: 10.1016/j.biocon.2003.06.004
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5261-5267. DOI: 10.1128/AEM.00062-07
- Wilson SD, Tilman D (1993) Plant competition and resource availability in response to disturbance and fertilization. *Ecology* 74: 599-611. [http://dx.DOI.org/10.2307/1939319](http://dx.doi.org/10.2307/1939319)
- Yu L, Nicolaisen M, Larsen J, Ravnskov S (2012) Succession of root-associated fungi in *Pisum sativum* during a plant growth cycle as examined by 454 pyrosequencing. *Plant and Soil* 358: 216-224. DOI: 10.1007/s11104-012-1188-5

Chapitre 3

Etude de l'impact des pratiques culturelles
sur les communautés des CMA à l'échelle
“de parcelles”

Introduction au Chapitre 3

Tout comme précédemment, le Chapitre 3 s'intéresse à l'impact des pratiques culturales sur la diversité des communautés de CMA mais cette fois-ci, à l'échelle de la parcelle et à plus long terme.

Pour ce faire, une collaboration avec l'INRA de Lusignan s'est mise en place. Cette collaboration m'a permis d'échantillonner sur l'Observatoire de Recherche en Environnement- Agroécosystèmes, Cycles Biogéochimiques et Biodiversité (ORE-ACBB) initié en 2005. Cet ORE est composé de plusieurs dispositifs expérimentaux dont l'un des sites complémentaires est situé à Lusignan. Il a pour problématique d'étudier le rôle des prairies temporaires dans les rotations céréalières afin de diminuer les risques environnementaux et de préserver la biodiversité. C'est pourquoi, sur ce site ont été mis en place plusieurs dispositifs expérimentaux. L'un d'entre eux a particulièrement retenu notre attention car il comportait cinq modalités de pratiques culturales dont deux correspondaient parfaitement à notre problématique : une rotation de cultures sans prairie temporaire (en rouge, Tableau 3.1) et une prairie permanente (en vert, Tableau 3.1). L'échantillonnage de ces parcelles s'est effectué durant deux saisons successives (2010 et 2011) et est composé d'une part de racines des plantes présentes sur les parcelles et d'autre part de sols collectés via le projet EcoFinders auquel nous avons participé.

Grâce au séquençage haut débit de L'ITS, marqueur choisi pour l'étude des Gloméromycètes dans le cadre du projet EcoFinders, nous avons étudié, à moyen terme, les différences de diversité des communautés de CMA entre prairie permanente et cultures de rotations sans prairie ainsi qu'entre type d'échantillons (sol vs. racines).

Tableau 3.1 : Planning des différentes modalités de cultures employées sur le site expérimental de l'ORE de Lusignan.

	2010			2011					
Culture 20 ans	Maïs	Blé	Orge	Maïs	Blé	Orge	Maïs	Blé	Orge
3 ans Culture/3 ans Prairie N+ fauche	Maïs	Blé	Orge				Maïs	Blé	Orge
6 ans Prairie / 3 ans Culture N+ Fauche							Maïs	Blé	Orge
6 ans Prairie / 3 ans Culture N- Fauche							Maïs	Blé	Orge
Prairie 20 ans N+ Fauche									

Arbuscular Mycorrhizal Fungal (AMF) molecular species in arable land are a subset of adjacent grassland communities.

Peyret-Guzzon M¹, Bouffaud ML¹, Stockinger H¹, Charrier X³ and Redecker D².

¹ INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

² Université de Bourgogne, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully, BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France.

³ INRA Poitou-Charentes, UE FERLUS, Les Verrines, 86600 Lusignan, France.

Corresponding author: Dirk REDECKER

UMR 1347 Agroécologie, BP 86510, 17 rue Sully, 21065 Dijon cedex, France

Phone +33 3 80 69 36 42, Fax +33 3 80 69 37 53

In preparation for Plant and Soil journal submission

Abstract

Aims This study investigated the effect of land use type (permanent grassland versus permanent culture) on AMF community composition.

Methods We used 454-pyrosequencing technology and the rDNA Internal Transcribed Spacer as molecular marker. Root and soil samples were taken in a long-term research observatory SOERE ACBB (Agroecosystems, Biogeochemical Cycles and Biodiversity) site.

Results Based on the sequences obtained, we defined 2,075 Operational Taxonomic Units and 38 molecular taxa (MTs). As expected, we found significant evidence that land use type strongly affects both AMF diversity and AMF community compositions even at the small-scale of our sampling area. A substantial proportion of MTs occurred across treatments but a number of indicator taxa were identified. The arable land AMF community was characterized by the absence of some molecular species identified as indicator species in the adjacent grassland. Although fewer soil samples were analysed than root samples, in the grassland, 70 % of MTs were found in both soil and roots, and 16 % only in roots (in arable soil, respectively: 43 % versus 46 %).

Conclusions In the studied system, arable land AMF taxa are a subset of those in the nearby grassland. Soil analyses in grasslands are a better approximation of AMF community harboured in root than in arable land.

Key words: Pyrosequencing, ITS, Molecular ecology, land use, arbuscular mycorrhizal, Community.

I. Introduction

Due to their symbiotic mutualistic relationships with most of terrestrial plants, Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) play a major role in plant ecosystems (Smith and Read, 1997). Beneficial performance effects of AMF to their host plants like nutrient uptake (Harrison *et al.*, 2002), pathogen resistance (Vigo *et al.*, 2000; de la Pena *et al.*, 2006), drought stress tolerance (Auge, 2001; Aroca *et al.*, 2007) and heavy metal tolerance (Leyval *et al.*, 1997) make them promising candidates to contribute to sustainable management of agricultural ecosystems (Jeffries *et al.*, 2003; Barrios, 2007) as well as to ecosystem restorations (Gaur and Adholeya 2004; Renker *et al.*, 2005).

DNA-based community studies of AMF have contributed considerably to a better understanding of AMF ecology, in particular in elucidating the influence of agricultural practice on the diversity of these fungi (An *et al.*, 1993; Öpik *et al.*, 2003). The latter is an important challenge in order to better use AMF functions in agricultural systems. A general rule that intensive agricultural management strongly affects AMF diversity can be deduced from previous studies (Dai *et al.*, 2013; Lumini *et al.*, 2010) and others based on spore morphology (Jansa *et al.*, 2002). Grasslands were usually found to harbour a relatively large diversity of these fungi whereas few species are able to adapt to soil disturbance and fertilization in arable land (Helgason *et al.*, 2002; Öpik *et al.*, 2006).

In these molecular diversity studies, DNA or RNA is extracted either from colonized roots or from soil. The fungi present inside the roots are all in an active symbiotic exchange with the host plant. As AMF are (as far as it is known) obligate biotrophes they can be expected to be found within roots at some point of their life cycle. Soil DNA comprises DNA from mycelium and from spores. The extraradical mycelium in the soil absorbs and transports nutrients towards the plant. The large multinucleate spores of AMF, which are resting stages and propagules, are mostly formed in the soil where they may accumulate over time and therefore deliver a picture of spore formation over several years. Some species also form spores within roots (in particular species in the genus *Rhizophagus*) or on the soil surface.

Whereas most molecular studies of AMF diversity have used roots, soil DNA is generally easier to sample and is the material of choice in studies where other soil organisms are analysed in parallel from the same DNA.

The relationship of AMF communities within vs. outside roots has been addressed in several previous studies, using cloning/sequencing approaches which are inherently limited by sequence sample size in comparison to high-throughput sequencing or genotyping methods such as DGGE which allow less specific conclusions about the identity of the taxa involved (Vossbrinck *et al.*, 1987). These studies came to differing conclusions, some of them highlighting strong discrepancies between the two compartments (Clapp *et al.*, 1995; Hempel *et al.*, 2007), others reporting largely similar compositions of the two (Borriello *et al.*, 2012).

In this study we addressed the question how land use affects AMF communities in our long-term field site and whether there are indicator species for land use changes in the long-term study site in France. We hypothesized that the community in arable soil is a subset of the one in grassland. Furthermore, we investigated whether root and soil samples can be equally used for these diagnoses.

II. Material and methods

A. Field sites and sampling

The sampling site was part of a long-term experiment which was started seven years ago, in the environment research observatory SOERE (LTO) ACBB (Agro-Ecosystème – Cycles Biogéochimiques et Biodiversité) of Lusignan, located in Poitou-Charentes region, France (46°24'N, 0°7'E). Root and soil were sampled (2011) in four replicate plots each of two land use types: permanent culture (PC) of maize, wheat, barley rotation and permanent grassland (PG). Grassland plots were mown two times before sampling and were nitrogen amended with ammonitrate for a total amount of 120 kg of nitrogen by hectare. Maize fields received 72 kg of nitrogen by hectare using Solufix 36-10. In maize fields, herbicide were added corresponding to a total amount of 1 L/ha of Milagro® (Syngenta, Guyancourt, France) and 1 L/ha of Callisto® (Syngenta, Guyancourt, France). Each soil sample was a composite sample of five soil cores (20 cm depth), roughly homogenized: four cores describing a square of one meter side length and one core in the centre of the square (https://www.youtube.com/watch?v=_k7BEInBXEc). Soil samples were sieved using a 4 mm mesh and stored at -20 °C until DNA extraction. Each root sample was a composite sample of washed and homogenized 1 cm-pieces roots taken from three soil cores (20 cm depth) at three aligned sampling points in a plot. Hence, twelve samples were comprised in the sampling: eight roots samples (four permanent grassland plots and four permanent culture plots) and four soil samples (two permanent culture plots and two permanent grassland plots).

B. DNA extraction and purification

Soil genomic DNA was extracted from 1 g of each soil sample using the ISOm protocol, described in (Plassart *et al.*, 2012). DNA extracts were purified in two steps. First, DNA was loaded onto polyvinylpolypyrrolidone minicolumns (BIORAD, Marne-la-Coquette, France) and centrifugated at 1,000 g for 2 min at 10 °C. Then, the eluate was purified using the Geneclean turbo kit (Q-Biogene, Illkirch, France).

Root samples were ground in liquid nitrogen using mortar and pestle. Genomic DNA was extracted from 70 mg of roots using a Dneasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. DNA was eluted in 70 µl and 50 µl AE buffer and kept at -20 °C.

C. PCR amplification and pyrosequencing

Root and soil samples were prepared for 454-pyrosequencing in a two-step PCR procedure in order to amplify the ITS part used as gene marker. A first PCR was performed using 0.4 U of Phusion High Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France), 1 x Phusion HF buffer, 0.5 µM of the primers SSUmCf and LSUmBr (Krüger *et al.*, 2009), 0.2 mM of each dNTPs and 1 µl of genomic DNA, in a final volume of 20 µl. The PCR conditions used were 5 min at 99 °C, 35 cycles of 10 s at 99 °C, 30 s at 63 °C and 1 min at 72 °C, followed by 10

min at 72 °C, using an Eppendorf Mastercycler ep gradient S (Vaudaux-Eppendorf, Schönenbuch, Switzerland). Each PCR product was checked on agarose gel, and diluted at 1/100 to use as template in the nested PCR. The nested PCR was performed using 1 U of Phusion High Fidelity polymerase, 1 x HF buffer, 0.5 µM of the primers ITS3m (Zhong *et al.*, 2010) and ITS4 (White *et al.*, 1990) with 5 bp barcodes, 0.2 µM of each dNTPs and 2 µl of diluted PCR product, in a total volume of 50 µl. PCR conditions were 30 s at 98 °C, 30 cycles of 10 s at 99 °C, 30 s at 64 °C and 20 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C, in an Eppendorf Mastercycler ep gradient S. PCR success was checked on an agarose gel. Each DNA extract was amplified three times. The three PCR products, with a size around 400 bp, were pooled and purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science, Meylan, France) following the manufacturer's instructions. After quantification using the Quant-iT™ Picogreen® dsDNA Assay kit (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France), the purified PCR products were mixed equimolarly to prepare sequencing libraries. The libraries were sent to Beckman Coulter Genomics (Grenoble, France) for sequencing, using a 454 GS FLX Roche instrument. Raw data of 454 pyrosequencing were submitted to European Nucleotide Archive database under the accession number (accession number pending).

D. Sequences and data analyses

Raw data were split into different files, according to sample, after removal of primer and barcode sequences. The filtered sequences were trimmed and denoised using Mothur v.1.32.0 (Schloss *et al.*, 2009). The resulting sequences were clustered using UCLUST algorithm of USEARCH (Edgar 2010) at 97 % identity threshold to create Operational Taxonomic Units (OTUs), and singletons were excluded from further analysis. Hence, OTUs were assigned to taxonomy: firstly, a Blast search against UNITE database was performed (e-value = 1.10^{-5}) and non-*Glomeromycota* sequences were excluded; Secondly, the EPA algorithm of RaxML (Berger and Stamatakis, 2011) was used to correct and improve the taxonomic assignment of the OTUs to Molecular Taxa (MTs) at the species-level wherever possible. We used the most recent classification (Redecker *et al.*, 2013). The number of sequences per sample was rarefied at a threshold of 3000 sequences.

Accumulation curves, diversity indices (Shannon) and richness indices (Chao1) of species-level MTs were obtained using EstimateS software v.9.0.0 (Colwell, 2013). Statistic Shannon diversity differences among treatments (land use type and sample type) were test using Kruskal-Wallis test in the stats package implemented in R software (version 2.15.1) (R development core team, 2013).

Differences in AMF community composition among land use type and sample type were tested using the MANOVA test with permutations in the R software and the vegan package (Oksanen *et al.*, 2013). Bray-Curtis distances were calculated from AMF abundance tables at the OTUs level and two MT-levels (genus and species). Resulting matrices were visualized in a Principal Coordinates Analyses (PcoAs) using the vegan and ade4 packages (Dray and Dufour, 2007; Dray *et al.*, 2007; Chessel *et al.*, 2014) of R software. In addition, analysis of Similarities (ANOSIM) with 2000 permutations was performed using vegan package in R in order to detect differences between treatments. Venn diagrams were performed to visualize shared MTs among treatments using R software.

Indicator species of land use type and sample type were identified using the *indicspecies* package (De Caceres and Jansen, 2013) of R software. Only species having both specificity and sensitivity values upper than 0.75 were kept. Variations of species-level MT abundances among sample type and land use type were tested using a pairwise Wilcoxon test with Bonferroni correction from the *stats* package implemented in R software.

Soil physical properties were log-transformed to normalize data, and differences among land use types (culture vs. grassland) were statistically tested by ANOVA using *stats* package implemented in R software.

III. Results

A. Sequences/OTUs/MTs/diversity and richness

After denoising sequences and removing singletons, 66012 sequences were available for further analysis, corresponding to 2,075 Operational Taxonomic Units, which were assigned to thirty-eight Molecular taxa (MTs). Depending on the sample, the number of OTUs ranged between 162 and 645 and the number of sequences between 3066 and 8336, Supplementary Table 3.1. Overall replicates, 38 MTs were identified belonging to different level of identification: species-level (23 MTs= 60.5 %), to genus-level (nine MTs) or to order-level (six MTs).

Table 3.2: Summary table of the number of Operational Taxonomic Units (OTUs), Molecular Taxa (MTs) and sequences per sample before and after subsampling 3,000 sequences threshold. In addition, diversity indices (Shannon and Chao1) per sample are shown.

Sample name	Treatment	Before subsampling			After subsampling			Diversity	
		Number of OTUs	Number of MTs	Number of sequences	Number of OTUs	Number of MTs	Number of sequences	Shannon index	Chao1 index
201110A	Roots_Grassland	357	17	6317	284	17	3000	1.92	17.50
201110F	Roots_Grassland	413	19	6211	328	16	3000	1.84	16.50
201110L	Roots_Grassland	362	22	5184	298	21	3000	0.97	23.00
201110O	Roots_Grassland	288	28	6957	214	27	3000	1.50	28.00
201110B	Roots_Culture	645	11	7089	514	9	3000	0.21	10.00
201110H	Roots_Culture	284	14	4143	244	14	3000	0.59	15.50
201110K	Roots_Culture	565	12	8336	413	11	3000	0.30	11.00
201110T	Roots_Culture	595	21	5233	495	21	3000	0.84	23.50
201110PC1	Soil_Culture	162	11	4395	145	9	3000	0.44	9.00
201110PC3	Soil_Culture	193	13	3066	192	13	3000	1.15	14.00
201110PG1	Soil_Grassland	379	21	3292	367	21	3000	2.33	21.50
201110PG4	Soil_Grassland	463	28	5789	366	27	3000	1.57	33.00

The accumulation curve analysis of each sample based on observed MTs at 3000 sequences indicates that the sampling effort was sufficient to obtain the great majority of AMF MTs (Figure 3.1). This result was confirmed by the Chao1 richness estimator analysis in which the number of MTs observed was close to the one estimated (Table 3.2). Therefore, a subset of 3,000 sequences per sample was used for analyses. Hence, the number of OTUs ranged from 145 to 514 while the number of species-level MTs ranged from nine to 27 (Table 3.2). The number of sequences per species-level MT for each sample is summarized in Table 3.3.

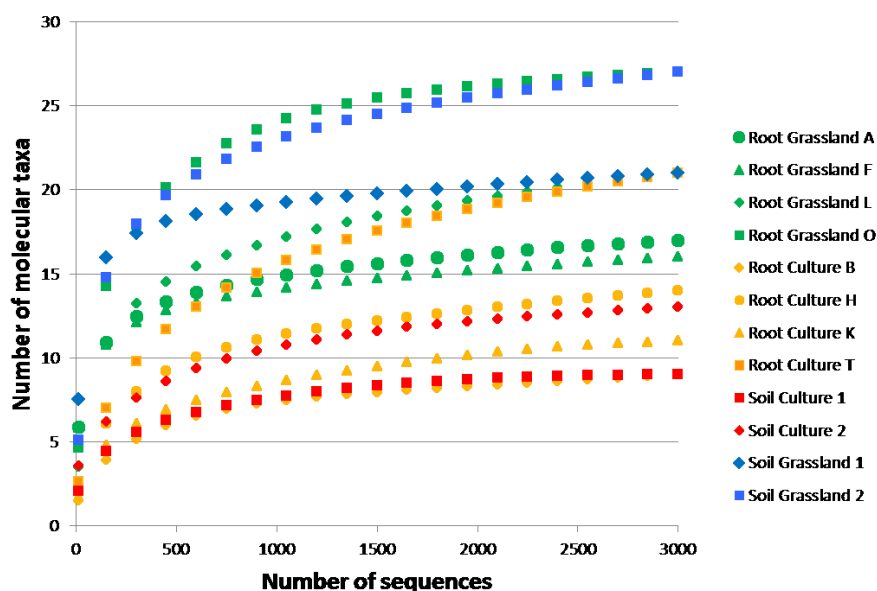


Figure 3.1: Accumulation curves analysis based on species-level molecular taxa performed with EstimateS software. Colours correspond to the four kind of samples analysed. Roots samples from grassland plots are in green whereas root samples from permanent culture are in orange. Soil samples from grassland plots are in blue whereas those from permanent culture are in red. Symbols correspond to different replicated in a given kind of sample (for a colour).

Table 3.3: Number of sequences belonging to each Molecular Taxa (MT) identified after subsampling at 3,000 sequences threshold.

Family MT	Order MT	Genus MT	Species MT\Sample name	Land use type				Permanent Grassland				Permanent Culture				Permanent Culture		Permanent Grassland	
				Sample type	Root	Root	Root	Root	Root	Root	Root	Root	Root	Root	Root	Soil	Soil	Soil	Soil
Archeosporales	Ambisporaceae	Ambispora	Ambispora appendicula	A	F	L	O	B	H	K	T	PC1	PC3	PG1	PG4				
Archeosporales	Ambisporaceae	Ambispora	Ambispora fennica	0	350	10	6	5	0	0	4	5	0	16	51				
Archeosporales	Ambisporaceae	Ambispora	Ambispora sp.	0	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1				
Archeosporales	Archaeosporaceae	Archaeosporaceae sp.	Archaeosporaceae sp.	16	1	33	1	1	6	2	0	0	0	156	163				
Archeosporales	Archaeosporaceae	Archaeospora	Archaeospora trappei	0	0	0	0	0	0	0	9	0	3	0	0				
Diversisporales	Acaulosporaceae	Acaulospora	Acaulospora alpina	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3				
Diversisporales	Acaulosporaceae	Acaulospora	Acaulospora cavernata	1	2	0	8	0	9	0	4	0	0	0	0				
Diversisporales	Acaulosporaceae	Acaulospora	Acaulospora sieverdingii like	0	0	0	5	0	9	0	8	0	0	0	8				
Diversisporales	Acaulosporaceae	Acaulospora	Acaulospora sp.	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0				
Diversisporales	Diversisporaceae	Diversispora	Diversispora celata	0	0	0	57	0	0	0	0	0	0	0	21				
Diversisporales	Diversisporaceae	Diversispora	Diversispora eburnea	0	0	2	82	17	0	46	0	0	0	0	3				
Diversisporales	Diversisporaceae	Diversispora	Diversispora epigaea	587	5	2385	3	0	2	67	27	42	334	558	189				
Diversisporales	Diversisporaceae	Diversispora	Diversispora sp. W5257	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	19	60				
Diversisporales	Gigasporaceae	Gigaspora	Gigaspora margarita	0	0	79	6	0	0	0	0	0	0	0	0				
Diversisporales	Gigasporaceae	Gigasporaceae sp.	Gigasporaceae sp.	0	0	0	8	0	0	0	2	0	0	0	0				
Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomerus	Claroideoglomerus claroideum	733	0	45	12	0	1	0	0	0	0	761	27				
Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomerus	Claroideoglomerus etunicatum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0				
Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomerus	Claroideoglomerus sp.1	455	0	186	50	0	0	0	1	0	0	337	5				
Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomerus	Claroideoglomerus sp.2	156	0	83	12	0	0	0	1	0	0	102	1				
Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglomerus	Claroideoglomerus sp.3	93	0	7	3	0	0	0	0	0	0	71	4				
Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis caledonius	0	1	0	3	0	2558	0	714	2683	1775	339	0				
Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis geosporus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0				
Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis mosseae	0	1230	0	1780	0	0	0	0	235	679	0	1845				
Glomerales	Glomeraceae	Glomeraceae sp.1	Glomeraceae sp.1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Glomerales	Glomeraceae	Glomeraceae sp.2	Glomeraceae sp.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9				
Glomerales	Glomeraceae	Glomeraceae sp.3	Glomeraceae sp.3	3	146	2	60	11	48	2	29	0	1	121	38				
Glomerales	Glomeraceae	Glomeraceae sp.4	Glomeraceae sp.4	7	17	1	5	0	19	2	9	0	6	52	15				
Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Glomus cerebriforme	0	0	29	9	0	0	0	0	0	0	82	0				
Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Glomus macrocarpum	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0				
Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Glomus sp.	0	0	0	19	0	1	0	6	0	0	1	1				
Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis	99	69	16	123	2886	312	2838	2145	17	3	112	39				
Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus sp.	25	128	62	41	7	6	14	2	2	3	112	39				
Glomerales	Glomeraceae	Scutellospora	Scutellospora gilmorei	696	0	0	599	0	0	0	2	0	0	0	81				
Glomerales	Glomeraceae	Scutellospora	Scutellospora sp.	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1				
Glomerales	Glomeraceae	Septoglomerus	Septoglomerus constrictum	97	366	29	17	65	18	2	19	11	156	131	334				
Glomerales	Glomeraceae	Septoglomerus	Septoglomerus sp.	12	12	1	4	1	0	0	1	0	12	11	15				
Glomerales	Glomeraceae	Septoglomerus	Septoglomerus viscosum	17	35	19	27	7	0	0	11	2	19	70	30				
Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomerus	Paraglomerus laccatum	2	460	5	59	0	10	10	4	0	8	48	47				

B. Land use and sample type effects on AMF diversity

A statistically significant difference in species diversity as estimated by the Shannon index (P : 0.043) was observed between all treatments whereas no significant difference was found for number of OTUs and number of species-level MTs (P -values are respectively 0.064 and 0.085). When soil and roots samples were grouped inside each land use type, Shannon diversity (P : 0.006, Figure 3.2a) as well as number of species-level MTs (P : 0.015) and mean species richness (estimated by Chao1 index, (P : 0.025, Figure 3.2c) were significantly higher in grassland comparing to culture whereas no significant difference was found for mean OTU number (Figure 3.2b).

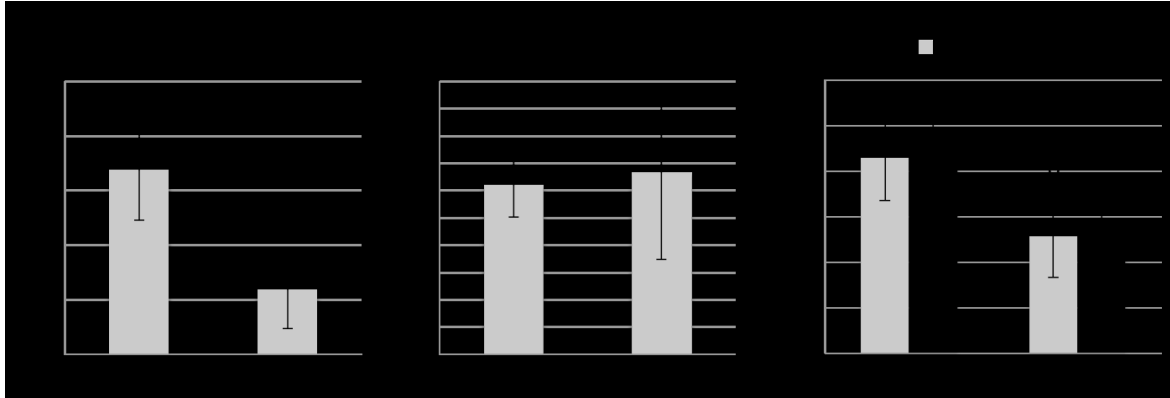


Figure 3.2: Differences among land use type of: a. Mean Shannon index; b. Mean Operational Taxonomic Unit (OTU) number; c. Mean Chao1 index and Mean species-level Molecular Taxa (MTs) number. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) among land use type. Bars represent standard deviation.

Table 3.4: Mean soil parameters among grassland and culture land use types. Statistical significant differences among land use types are highlighted in grey.

Land use type		Grassland	Culture
pH		6.44	6.60
Granulometry g/kg	Clay (< 2 μ m)	177.00	184.33
	Fine loam (2/20 μ m)	398.33	363.00
	Coarse loam (20/50 μ m)	239.67	301.00
	Fine Sand (50/200 μ m)	113.00	67.33
	Coarse sand (200/2000 μ m)	71.00	83.33
g/kg	Residual water content 105°C content 105°C	12.50	10.20
	Organic Carbon (C)	13.57	10.23
	Total N	1.18	0.97
	C/N	11.47	10.57
	Organic matter	23.47	17.67
	Phosphorus (P2O5 OLSEN)	0.05	0.07
Cobaltihexamine cmol+/kg	CEC	6.87	7.07
	Ca	5.97	6.06
	Mg	0.36	0.40
	Na	0.03	0.04
	K	0.11	0.20
	Fe	<0.005	0.007
	Mn	0.12	0.07
DPTA mg/kg	Al	0.04	0.05
	Cu	1.39	1.77
	Fe	60.57	46.43
	Mn	73.67	56.60
	Zn	0.89	3.03

According to ANOVA results, a significant impact of land use type was observed upon some of the soil parameters measured. Thus, the grassland presented more fine sand content than the culture (P : 0.03). Besides, grassland plots have higher concentrations of organic carbon (P : 0.01), total nitrogen (P : 0.01), organic matter (P : 0.01), carbon/nitrogen ratio (P : 0.01) and manganese (P : 0.03) compared to culture plots, whereas culture plots were shown to have more potassium (P : 0.01), iron (P : <0.001) than grassland plots. In contrast, no significant difference was found for calcium, phosphorus, sodium concentrations and pH, for example (see Table 3.4).

In order to visualize the AMF community of the four treatments studied, Principal Coordinate Analyses (PCoAs) were performed on Bray-Curtis distance matrices based on MT at species-level (Figure 3.3). This representation explained 62 % of overall variability (axe 1: 35.2 % and axe 2: 27.4 %). A clear grouping of samples according to land use types (grassland vs. culture) is apparent. In the culture treatment, a clear separation of samples depending on sample type (soil vs. root) can be noticed. In contrast, root and soil samples of the grassland treatment were closely grouped together. The ANOSIM results to test the clustering of our samples in four groups were significant (P : 0.005) even if the R -value (0.54), suggests a moderate separation of these four groups probably due to the absence of separation of grassland soil and root samples. Hence, data were split up according to the kind of samples (root and soil samples). ANOSIM results based on root samples were significant (P : 0.026) with an R -value of 0.875 validating the separation of root samples according to land use type (culture vs. grassland). However, when samples are grouped according to sample types (culture and grassland together), no overall statistical significance was found (P : 0.11). Statistical analyses of interaction effects of land use type and sample type were not significant (P : 0.31). PCoAs and statistical tests both based on OTUs and MT genus-level revealed similar results (data non shown) suggesting that land use is the main driver of AMF community composition.

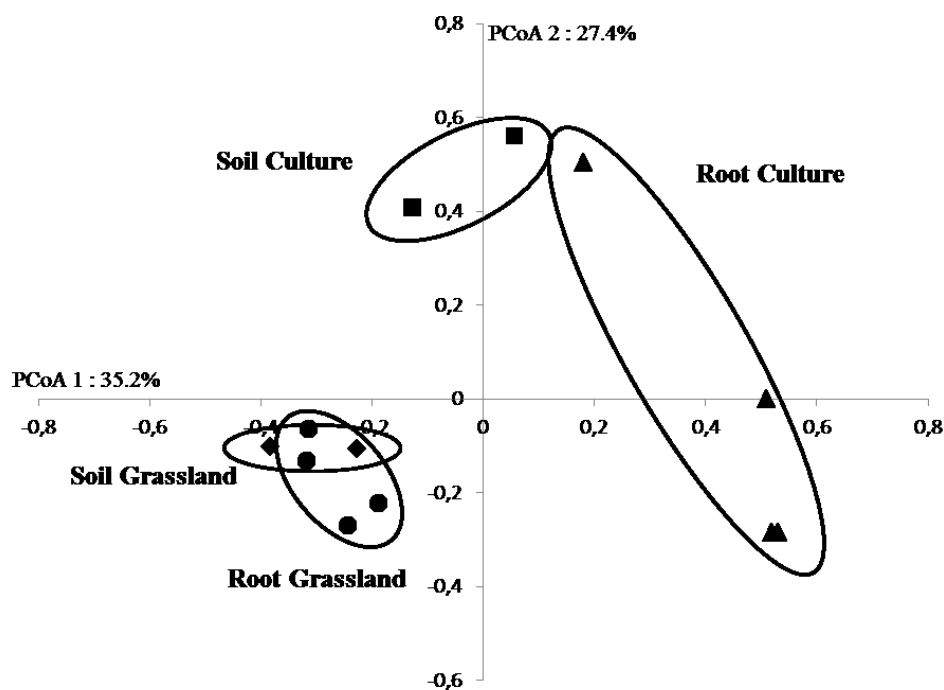
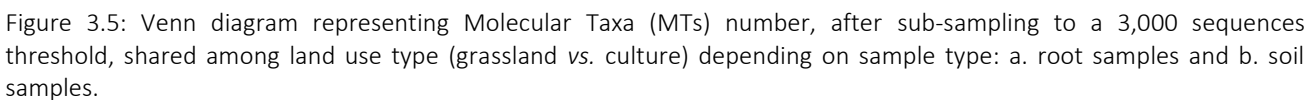
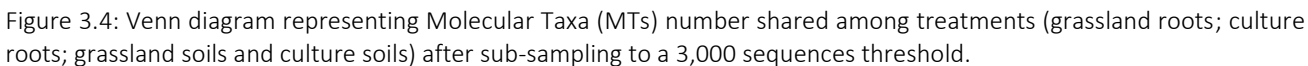


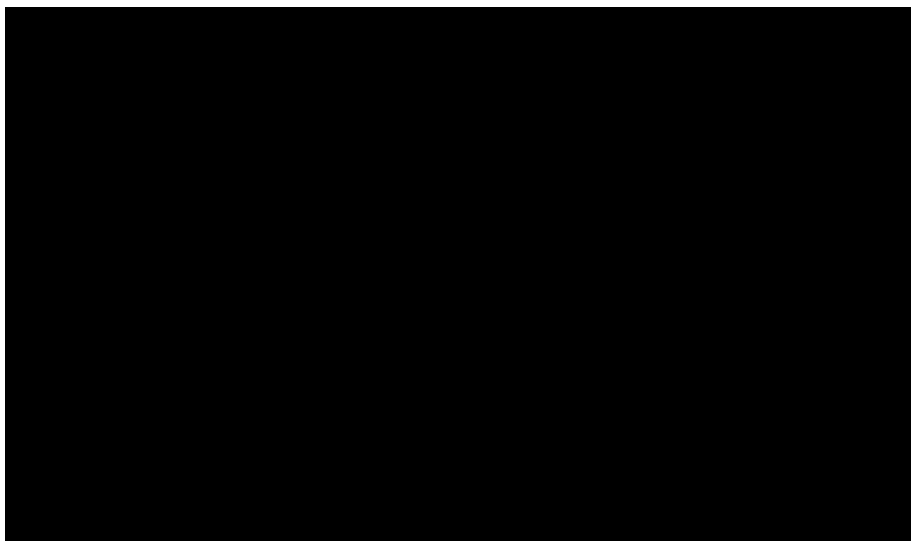
Figure 3.3: Principal Coordinates Analysis (PCoA) of the bray-Curtis matrix based on species-level Molecular Taxa (MTs) abundances after subsampling at 3,000 sequences threshold.



Two additional statistical analyses were performed on the species-level MTs: indicator species analysis and Wilcoxon pairwise comparison. Indicator species analysis identifies species whose presence is significantly ($P < 0.05$, Table 3.5) associated with the treatment tested, whereas the Wilcoxon test highlights MT abundance variation dependent on the tested treatment. Indicator species were identified for the permanent grassland (e.g. two *Septoglomus* species, four *Claroideoglossum* species, *Paraglossum laccatum*, *Archaeosporaceae sp*, *Ambispora fennica*) whereas none was found for permanent culture (Table 3.5). Furthermore, Wilcoxon tests show that the proportion of *Rhizophagus* sp., in addition to the species previously mentioned increased significantly ($P: 0.005$) in the permanent grassland. Using the same test, *Rhizophagus irregularis* was the only species whose abundance increased significantly ($P: 0.008$) in the root samples.

These results suggest that permanent grasslands are characterized by typical species and their abundances, in contrast to permanent culture, which is merely defined by the absence of those species. All these results pointed out the large difference in AMF community composition (presence and abundances) depending on land use type as well as a weaker differentiation by sample type.

Table 3.5: Tables of significant p-values for indicator species identified and significant abundance variations among treatments using Wilcoxon test. Non-significant p-values are noted as *n.s.*



IV. Discussion

In this study, the diversity of AMF communities was investigated using pyrosequencing of a molecular marker from the rRNA gene region. Accumulation curves analysis based on MTs suggested that the diversity observed was close to the one estimated, indicating that the sampling effort was sufficient regardless of land use type or sample type.

A. Influence of land use type

The influence of land use types on AMF diversity has been addressed in numerous studies, either based on spore analyses (Oehl *et al.*, 2003; Oehl *et al.*, 2010) or based on molecular data, beginning with the one by Helgason *et al.* (1998).

The general conclusion from most of these studies is a decrease of AMF diversity, which was observed along a gradient of management intensity, starting from (semi) natural habitats. However, few of these articles used stringent statistical criteria to identify indicator species as we did. Moreover, our long-term research site presents the advantage of nearly identical soil conditions and spatial proximity, allowing to better pinpoint environmental parameters responsible for an observed differentiation of communities.

The effect of land use can be sometimes be explained by the differences of agricultural practice associated with the land use type. Differences observed among land use type are often attributed to soil disturbance. Previous studies using soil samples (Egerton-Warburton, 2000; Jansa *et al.*, 2002) and root samples (Borriello *et al.*, 2012. Stockinger *et al.*, in press, Annexe; Peyret-Guzzon *et al.*, submitted, Chapitre 1) have pointed out the impact of soil disturbance on AMF community composition. The systematic disruption of hyphal network and low host plant diversity may contribute to modify the AMF community diversity, compared to grasslands, favouring fast-colonizing species with an r-type life history strategy already present in the soil compartment.

Other studies identified fertilization as a major factor influencing AMF communities (Sieverding, 1990, Wang *et al.*, 2011). Previous studies evaluated species spore abundances by morphology, reported a shift of AMF communities along a gradient of an anthropogenic nitrogen gradient (Egerton-Warburton, 2000). Those authors found that an increase of nitrogen negatively influenced AMF spore diversity and richness. In addition, a recent study using pyrosequencing (Lin *et al.*, 2012) showed an influence of N fertilization on AMF communities in the field. These authors showed that long-term P fertilization with additional N fertilization decreased AMF community richness and diversity.

As in the present study total soil N contents were significantly higher in the grassland than in the culture plots due to the N fertilization applied, both fertilization and ploughing may have contributed to the changes observed as well as differences in organic matter content, whereas soil pH, climatic factors and geographic distance obviously can be ruled out.

B. Sample type

Differences between AMF communities analysed based on root and on soil samples were reported previously in a farm meadow (Hempel *et al.*, 2007), in an alpine meadow (Yang *et al.*, 2013) and in a potato field (Cesaro *et al.*, 2008). On the contrary, in maize fields, Borriello *et al.* (2012) found similar communities in different sample types, regardless of soil disturbance and fertilization treatment applied. In this study, land use effects were clearly stronger than the sample type effects, and as only two pairs of soil samples were available, we did not

expect strong statistically supported differences. Indeed the only indicator species identified was *Rhizophagus irregularis*, which is known to prolifically colonize roots and to sporulate within them. Relatively few taxa were exclusively detected in soil.

Interestingly, we found a large overlap between root and soil-borne communities (70 %) in the grassland, which was however smaller in the arable field (43 %). This is somewhat surprising as in the arable soil the proportion of taxa readily dispersing by rapid spore production would be expected to be larger. This might suggest that in the arable land relatively few AMF species preferentially proliferate in the roots without forming extensive mycelia or spores, an interesting hypothesis to be tested in further research.

C. Indicator species

In concordance with most previous AMF community composition studies we found a core set of species present in all treatments and others preferentially found in a given treatment.

Oehl *et al.* (2010), analysed AMF community composition based on spores from trap cultures, with regard to soil type and land use intensity across geographically separated sites. Two land use types, grassland and arable land, were analysed. The authors showed that increasing land use intensity negatively affects AMF community diversity in several soil types and set up categories for species specialized or generalist with regard to these conditions. *Funneliformis caledonium* for example was classified as a specialist for arable soils and siliceous soils, whereas a larger number of fungal species was considered to be typical for grasslands. Morphological approaches using spores evidently are biased by the sporulation behaviour of AMF species, which may well differ between specialists and generalists and in the different habitats. Moreover, this study used an outdated classification of the *Glomeromycota*, thereby missing large genetic differences between species in the "*Glomeraceae*". It should also be noted that several of the families found in grasslands (*Gigasporaceae*, *Acaulosporaceae*) in that study, were scarcely represented in our samples.

In this study, all indicator species we identified were characteristic of the grasslands, not of the arable land. *Funneliformis caledonium*, an indicator of arable land after Oehl *et al.* (2010) was prominently present in roots and soil of some of the arable plots, but apparently lacked the regularity in prevalence to be scored as an indicator. This may be due to the stronger heterogeneity of the arable land samples as evident in the PCoA (Figure 3.1), which may be attributed to a strong stochastic component in AMF community assembly in this kind of habitat, resulting from the recruitment of a subset of taxa present in the grassland.

Among the indicator species for the grassland, *Ambispora fennica*, an *Archaeosporaceae* sp, *Claroideoglossus*, *Paraglossus* and *Septoglossus* were identified. Few is known about the ecology of the genus *Ambispora*, except that it was rarely detected in arable systems. Four molecular taxa in *Claroideoglossus* showed a similar preference for the grassland and were all identified as indicators. *Claroideoglossus* was previously reported to be less abundant when mineral fertilisation was applied and to increase with altitude in a study by (Jansa *et al.*, 2014). Competition between this species and *Rhizophagus irregularis* was reported (Thonar *et al.*, 2014). This

competition may explain the quasi absence of sequences found in culture root samples where *Rhizophagus irregularis* was found as dominant with *Funneliformis caledonius*. Little is known about the ecology of *Claroideoglossus* genus that has recently been split from the *Glomeraceae* family (Schüßler and Walker, 2010). *Paraglossus* genus which were found everywhere in this study was previously reported to increased in abundance in soil disturbed grassland at the short term (Peyret-Guzzon *et al.*, submitted) which in accordance with its abundance increase trend in grassland samples.

Rhizophagus irregularis was reported to be one of the phylotypes shared between vineyard soil and root samples (Balestrini *et al.*, 2010; Cesaro *et al.*, 2008). Dominance of *Rhizophagus* species (*Rhizophagus sp.* and *Rhizophagus irregularis*) in the permanent culture roots is in accordance with the tolerance of those genera to hyphal network disruption (Öpik *et al.*, 2006).

Surprisingly, *Funneliformis mosseae* well known to be a fast colonizer (Jansa *et al.*, 2008) adapted and favoured by soil disturbance (Jansa *et al.*, 2002), conspicuously was not detected in roots in the arable treatment. Similar results were reported in a previous study in a potato field (Cesaro *et al.*, 2008, Rosendahl and Stuckendbrock, 2004). Besides, Jansa *et al.* (2008) reported a LSU copy number decreased of *Funneliformis mosseae* in roots at eight weeks of co-inoculation with *Rhizophagus irregularis* after a rapid increased at four weeks. Thus, it is possible, one month later that a shift from *Funneliformis mosseae* to *Rhizophagus irregularis* was more pronounced in roots from arable plots than in grassland plots. However, this molecular species evidently was abundant in the grassland. Sýkorová *et al.* (2007) demonstrated the absence of this species in roots in a semi-natural calcareous grassland, where it was however apparently present as spores and colonized roots after disturbance, an obviously different behaviour from the fertilized grassland we studied here. It is interesting to note that *Funneliformis caledonium* was found abundant in the permanent culture roots where *Funneliformis mosseae* was not detected which could be due to competition between those species and further studies should focus on it.

We observed the presence of *Paraglossus laccatum* in all treatments and it was identified as a indicator species for permanent grassland. Lumini *et al.* (2010) found *Paraglossomerales* in pasture but not in tilled arable fields. The genus was reported to respond to fertilization treatments in a study on field sites across England (Gosling *et al.*, 2006). The genus was also reported to be dominant in the maritime ecozone of Canada and rare in grassland analysed in the same study (Dai *et al.*, 2013). In another study performed in our lab, it was found to be promoted by soil disturbance (Peyret-Guzzon *et al.*, submitted, Chapitre 2). *Paraglossus* was previously reported to be more frequently found in soil than in roots, and even to be absent from roots (Hempel *et al.*, 2007), suggesting that more attention should be spent to understand the ecology of this genus which was frequently not be detected in AMF community study due to its spore size and primer mismatches (Stockinger *et al.*, 2009; Stockinger *et al.*, 2010; Oehl *et al.*, 2010).

The two *Septoglossus* species, which were more abundant in grassland plots, were identified as indicator species for this land use type. The genus is relatively new and therefore poorly documented with regard to its ecology; particularly as its member species are morphologically quite dissimilar. Contrary to the results presented here, *Septoglossus viscosum* was already identified as indicator species for soil disturbance treatment of grassland (Peyret-Guzzon *et al.*, submitted). In the same study, we found that the abundance of this species was significantly

altered by nitrogen fertilization. It is thus possible that this species is affected by the higher content of nitrogen found in the grassland plots.

Conclusion

This is the first study using new generation sequencing technology to compare AMF community composition in soil and root sample types in two land use types. Our findings provide new insights to better understand AMF community ecology at the small-scale. We demonstrate the presence of a core set of AMF species common to both land use type. Our results and confirm the strong influence on AMF community composition by land use and suggest that AMF community found in permanent culture may be recruited from the community available in grassland. To test these hypotheses, analyses of the respective species on the population level will be necessary.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge funding by the FABER programme of the Regional Council of Burgundy and the European FP7 project EcoFINDERS.

Conclusion du Chapitre 3

Via l'utilisation des nouvelles technologies de séquençage haut-débit, nous avons pu démontrer que l'assemblage des communautés de CMA varie selon le type d'usage de sol à moyen terme et à l'échelle de parcelles suggérant que le retournement du sol et la fertilisation azotée sont les principaux facteurs influençant cet assemblage même si d'autres paramètres physico-chimiques peuvent aussi l'affecter.

Cette étude met en évidence la présence d'un ensemble d'espèces présentes dans les deux types d'usage de sol et d'autres préférentiellement inféodées aux prairies faisant de ce-dernier un réservoir de diversité d'espèces de CMA.

Nous avons aussi montré que l'analyse d'échantillons de sols de prairies constitue une meilleure approximation des symbioses actives au sein des racines que celle des échantillons de sols des champs cultivés.

Enfin, cette étude permet de faire valoir l'importance de l'analyse des effets des pratiques culturales sur l'établissement et le maintien des communautés de CMA aux champs et participe à sa compréhension.

Références bibliographiques du Chapitre 3

- An ZQ, Hendrix JW, Hershman DE, Ferriss RS, Henson GT (1993) The influence of crop-rotation and soil fumigation on a mycorrhizal community associated with soybean. *Mycorrhiza* 3: 171-182. DOI: 10.1007/BF00203611
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* 173: 808-816. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01961.x
- Auge RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42. DOI: 10.1007/s005720100097
- Barrios E (2007) Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* 64: 269-285. DOI: 10.1016/j.ecolecon.2007.03.004
- Balestrini R, Magurno F, Walker C, Lumini E, Bianciotto V (2010) Cohorts of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. *Environmental Microbiology Reports* 2:594-604. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00160.x
- Berger SA, Stamatakis A (2011) Aligning short reads to reference alignments and trees. *Bioinformatics* 27: 2068-2075. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr320
- Borriello R, Lumini E, Girlanda M, Bonfante P, Bianciotto V (2012) Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biology and Fertility of Soils* 48: 911-922. DOI: 10.1007/s00374-012-0683-4
- Cesaro P, van Tuinen D, Copetta A, Chatagnier O, Berta G, Gianinazzi S, Lingua G (2008) Preferential colonization of *Solanum tuberosum* L. roots by the fungus *Glomus intraradices* in arable soil of a potato farming area. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5776-5783. DOI: 10.1128/AEM.00719-08
- Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J (2014) The ade4 package-I- One-table methods. *R news* 4: 5-10.
- Clapp JP, Young JPW, Merryweather JW, Fitter AH (1995) Diversity of fungal symbionts in arbuscular mycorrhizas from a natural community. *New Phytologist* 130: 259-265. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb03047.x
- Colwell RK (2013) EstimateS, Version 9.1.0: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. <http://viceroyeebuconnedu/estimates/>.
- Dai M, Bainard LD, Hamel C, Gan Y, Lynch D (2013) Impact of land use on arbuscular mycorrhizal fungal communities in rural Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 6719-6729. DOI: 10.1128/AEM.01333-13
- De Caceres M and Jansen F (2013) Studying the statistical relationship between species and groups of sites. Package *indicpecies* v 1.7.1. <http://cranr-projectorg/web/packages/indicpecies/indexhtml>.
- de la Pena E, Rodriguez-Echeverria S, van der Putten WH, Freitas H, Moens M (2006) Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* 169: 829-840. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01602.x
- Dray S, Dufour AB (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22: 1-20.
- Dray S, Dufour AB, Chessel D (2007) The ade4 package-II: Two-table and K-table methods. *R News* 7: 47-52.
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Egerton-Warburton LM, Allen EB (2000) Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications* 10: 484-496. DOI: 10.1890/1051-0761(2000)010[0484:SIAMCA]2.0.CO;2
- Gaur A and Adholeya A (2004) Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Current Science* 86: 528-534.
- Gosling P, Hodge A, Goodlass G, Bending GD (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. *Agriculture Ecosystems and Environment* 113: 17-35. DOI: 10.1016/j.agee.2005.09.009
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429. DOI: 10.1105/tpc.004861
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998). Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431. DOI: 10.1038/28764

- Helgason T, Merryweather JW, Denison J, Wilson P, Young JPW, Fitter AH (2002) Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *Journal of Ecology* 90: 371-384. DOI: 10.1046/j.1365-2745.2001.00674.x
- Hempel S, Renker C, Buscot F (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930-1938. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01309.x
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234. DOI: 10.1007/s005572-002-0163-z
- Jansa J, Smith FA, Smith SE (2008) Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177: 779-789. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37: 1-16. DOI: 10.1007/s00374-002-0546-5
- Krüger M, Stockinger H, Krüger C, Schüßler A (2009) DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 183: 212-223. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7: 139-153. DOI: 10.1007/s005720050174
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H (2012) Long-term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in north China revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science and Technology* 46: 5764-5771. DOI: 10.1021/es3001695
- Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, Bonfante P, Bianciotto V (2010) Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology* 12: 2165-2179. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02099.x
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mäder P, Boller T, Wiemken A (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816-2824. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003
- Oehl F, Laczko E, Bogenrieder A, Stahr K, Bosch R, van der Heijden M, Sieverding E (2010) Soil type and land use intensity determine the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 724-738. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.01.006
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2013) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Koljalg U, Zobel M, Sen R (2003) Divergent arbuscular mycorrhizal fungal communities colonize roots of *Pulsatilla* spp. in boreal Scots pine forest and grassland soils. *New Phytologist* 160: 581-593. DOI: 10.1046/j.1469-8137x.2003.00917.x
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x
- Peyret-Guzzon M, Stockinger H, Bouffaud ML, Farcy P, Redecker D (submitted) Effects of short-term soil disturbance and fertilization on arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations in a grassland.
- Pinheiro J, Bates D, Debroy S, Sarkar D, R core team (2014) Package nmle. Linear and nonlinear mixed effects models. <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>.
- Plassart P, Terrat S, Thomson B, et al. (2012) Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *PLOS ONE* 7: 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0044279
- R development core team (2013) R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria*. ISBN 3-900051-07-0, URL:<http://www.R-project.org/>.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stuermer SL, Morton JB, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23: 515-531. DOI: 10.1007/s00572-013-0486-y
- Renker C, Blanke V, Buscot F (2005) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in grassland spontaneously developed on area polluted by a fertilizer plant. *Environmental Pollution* 135: 255-266. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.11.002

- Rosendahl S and Stukenbrock EH (2004) Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences. *Molecular Ecology* 13: 3179–3186. DOI: 10.1111/j.1365-294.2004.02295.x
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. (2009) Introducing mothur: open-Source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541. DOI: 10.1128/AEM.01541-09
- Schüßler A and Walker C (2010) The *Glomeromycota*. A species list with new families and new genera. *The Royal Botanic Garden Edinburgh, The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich, and Oregon State University*.
- Sieverding E (1990) Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 29: 369-390. DOI: 10.1016/0167-8809(90)90303-U
- Smith SE and Read DJ (1997) Mycorrhizal symbiosis. Academic Press.
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A (2009) 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 183: 1176-1187. DOI: <http://www.jstor.org/stable/40302144>
- Stockinger H, Krüger M, Schüßler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187: 461-474. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x
- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Bouffaud ML, Koegel S, Redecker D (2014) The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLOS ONE* 9(10): e107783 DOI: 10.1371/journal.pone.0107783
- Sýkorová Z, Wiemken A, Redecker D (2007) Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5426-5434. DOI: 10.1128/AEM.00987-07
- Thonar C, Frossard E, Smilauer P, Jansa J (2014) Competition and facilitation in synthetic communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 23: 733-746. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03086.x
- Vigo C, Norman JR, Hooker JE (2000) Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology* 49: 509-514. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2000.00473.x
- Vossbrinck CL, Maddox JV, Friedman BA, Debrunner-Vossbrinck BA, Woese CR (1987) Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326: 411-414. DOI: 10.1038/326411a0
- Wang FY, Hu JL, Lin XG, Qin SW, Wang JH (2011) Arbuscular mycorrhizal fungal community structure and diversity in response to long-term fertilization: a field case from China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 67-74. DOI: 10.1007/s11274-010-0427-2
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (eds) PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press.
- Yang W, Zheng Y, Gao C, He XH, Ding Q, Kim Y, Rui YC, Wang SP, Guo LD (2013) The arbuscular mycorrhizal fungal community response to warming and grazing differs between soil and roots on the Qinghai-Tibetan Plateau. *PLOS ONE* 8: 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0076447
- Zhong JS, Li J, Li L, Conran JG, Li HW (2010) Phylogeny of *Isodon* (Schrader ex Benth.) Spach (Lamiaceae) and related genera inferred from nuclear ribosomal ITS, trnL-trnF region, and rps16 intron sequences and morphology. *Systematic Botany* 35: 207-219. DOI: <http://dx.doi.org/10.1600/036364410790862614>

Chapitre 4

Etude de l'impact des pratiques agricoles sur
les communautés des CMA à plus vaste
échelle

Introduction au Chapitre 4

Tandis que certains genres ou espèces de CMA semblent être présents aussi bien dans les cultures que dans les prairies jusqu'à avoir, pour certains, une répartition globale (Öpik *et al.*, 2006); d'autres semblent inféodés à un type d'usage de sols. Ces répartitions ont précédemment été liées aux stratégies d'histoire de vie des espèces (Sýkorová *et al.*, 2007) ou à celles de leur populations (Börstler *et al.*, 2010), mais aussi aux types d'écosystèmes considérés (Öpik *et al.*, 2006), au pH (Drumbell *et al.*, 2010) ou à la latitude (Johnson *et al.*, 2010).

Puisque la France est le pays de l'Union européenne qui comporte la plus grande superficie agricole et que les objectifs de la Politique Agricole Commune s'attachent à réduire de façon drastique les apports de fertilisants dans les agroécosystèmes, il nous a paru tout naturel de s'intéresser aux facteurs influençant la répartition des communautés de CMA sur ce territoire.

Or, le Groupement d'Intérêt Scientifique Sol (GISSol) a pour but de constituer et de gérer les informations concernant les sols français et notamment leurs qualités. Dans ce cadre, l'unité InfoSol d'Orléans a créé le Réseau de Mesures de la Qualité des Sols (RMQS) dont l'objectif est d'établir et de suivre l'état des sols français. Ainsi, le territoire français a-t-il été subdivisé en 2200 sites représentant chacun une zone de 16 km² et chaque sol de cette maille a été échantillonné en son centre et analysé. Le RMQS offre donc une excellente source d'échantillons qui sont gérés par la plateforme GenoSol de l'INRA de Dijon. C'est pourquoi nous avons mis en place une collaboration avec les unités InfoSol et GenoSol.

Ainsi, dans ce chapitre, avons-nous cherché à étudier les facteurs influençant la répartition des communautés de CMA à l'échelle nationale et en particulier entre types d'usage de sol (culture vs. prairies) et entre pratiques culturales (cultures avec ou en absence de prairies temporaires et prairies de plus de 10 ans naturelles ou semées). De plus, nous avons cherché à savoir s'il existait une répartition géographique de ces communautés.

Pour ce faire, nous avons analysé les séquences obtenues par pyrosequençage des amplicons du gène marqueur RPB1 issus de 39 échantillons de sols fournis par le GISSol et le GenoSol.

Mots clés : Séquençage haut-débit, mycorhize à arbuscules, RPB1, communauté, France, pratiques culturales, type d'usage de sol.

Structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities in agricultural soils across France.

Manuscript in preparation

Abstract

In this study we investigated at the French national scale environmental factors influencing arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) community composition in agricultural soils. Soil samples originating from a French national sampling survey aimed at identifying environmental indicators of soil quality were used. Analysis of sequences of the large subunit of the RNA polymerase II gene (RPB1) obtained by 454-pyrosequencing from 39 soil samples, helped to identify land use type (i.e. arable land vs. grassland), as the major factor structuring AMF community composition. We identified genera and OTUs as indicator for these types. Other relevant factors were agricultural practices such as grassland intercropping, soil composition and climate. Geographic distance correlation was significant for community composition on the OTU level but not on the genus-level, and clearly driven by a few clearly distinct samples from the Mediterranean zone. Even though we limited our sampling to a narrow range of soil pH, we found a significant pH effect on AMF community structure.

This study demonstrates the predominance of land use as a factor shaping AMF communities in agricultural soils across the French landscape and provides indicators for land use types. These findings will contribute to a better understanding of the distribution and ecological function of AMF communities at the national/regional scale, required for a better management of this functional fungal community in sustainable agrosystems.

Key word: arbuscular mycorrhiza; agricultural practice; land use; RPB1; pyrosequencing.

I. Introduction

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) form a mutualistic symbiosis with roots of most land plants. Beneficial effects on plant such as increased growth performance under drought stress (Auge 2001; Aroca *et al.*, 2007), increased tolerance to pathogen (Vigo *et al.*, 2000; de la Pena *et al.*, 2006) or to heavy metal (Leyval *et al.*, 1997) have been shown. AMF are also involved in maintaining soil structure stability (Mummey and Rilling, 2006). The principal benefit of AMF on plants, however, is an improved uptake of mineral nutrients (especially phosphorus and nitrogen) making AMF prime candidates for a major role in future sustainable agriculture (Harrison *et al.*, 2002; Jeffries *et al.*, 2003; Barrios 2007; Gianinazzi *et al.*, 2010; Fitter *et al.*, 2011). In order to manage AMF communities in agroecosystems and their benefits in agriculture, a better understanding of factors influencing AMF diversity and composition in agroecosystems is needed.

Evidence shows that AMF taxa can differ in their life history strategies and their tolerance to agricultural practices (Sykorova *et al.*, 2007) allowing some taxa to have a global distribution (Öpik *et al.*, 2006). The biogeography of microorganisms has been disputed since it became possible to assess their diversity on a larger scale using molecular markers. Many authors tried to verify or falsify the famous hypothesis of Baas-Becking that for microbes “everything is everywhere but the environment selects” (Baas-Becking, 1934). Results concerning this hypothesis have been mixed, but for some microorganisms, including fungi (Whitaker *et al.*, 2003, Taylor *et al.*, 2006) it was demonstrated that diversity of microorganisms is dispersal-limited and thus to some extent dependent on geographical distance (see review by Martiny *et al.*, 2006). Pellissier *et al.*, (2014), for instance showed in grasslands that at a regional scale along an elevation gradient in Switzerland, fungi did indeed show OTU-area relationships but also followed environmental factors.

All AMF belong to the *Glomeromycota* phylum (Schüssler *et al.* 2001), including at this time, around 250 species. The ecological function of many of these species is poorly characterized. AMF diversity and community composition have been shown, by meta-analysis surveys, to vary depending on ecosystems and geographic distance at the global scale (Opik *et al.*, 2006; Kivlin *et al.*, 2011) or at the national scale (Dai *et al.*, 2013). Using a quantitative PCR approach for six AMF species across Switzerland, Thonar *et al.*, (2014) demonstrated that soil type and geography are both important determinants of AMF community structure. On the other hand, AMF in agricultural soils did not seem to be dispersal-limited, as for example *Funneliformis mosseae* where the lack of intraspecific genetic structure in a global sample of isolates was interpreted as evidence for a recent expansion of this species around the world facilitated by agriculture (Rosendahl *et al.*, 2009). Therefore the question, whether AMF frequently found in arable soils (which are often generalists) show less geographical structure than those specialized in less intensively cultivated soils such as mowed and grazed grasslands habitats, remains open.

The French Soil Quality Monitoring Network (RMQS) was established to investigate microbial biodiversity and abundance at a national scale. The goal of this programme was to identify biogeographical microbial patterns. Soil samples were taken following a 16km-grid across continental France (Dequiedt *et al.*, 2011), resulting in over 2000 GPS-mapped sampling points. Soil DNA was extracted using a standardized procedure and used to assess the diversity of soil microbiota using various DNA-based approaches. Among the results from this initiative are studies

of microbial biomass (Dequiedt *et al.*, 2011), as well as bacterial diversity (Dequiedt *et al.*, 2009) and its turnover rate (Ranjard *et al.*, 2011). No analyses targeting AMF have been conducted so far in the programme. Therefore, we used DNA material provided by this network to obtain a first glimpse of AMF diversity at the France the national scale. To address effects of land use and geography in the agricultural context, we focused on a subset of the RMQS samples from grasslands and two types of arable soils. As it was previously been shown that soil pH influences AMF communities (Hazard *et al.*, 2014) we restricted our subsample to soils with a pH of 6 to 7.

The objective of this work was to study the effects of land use on AMF communities in a geographical context, and to identify indicators across the range of our sampling. Our hypothesis was that geographical distance influences the composition of glomeromycotan communities thereby modulating the effects of land use. As a novel molecular marker we used a region of the RNA polymerase II (RPB1) gene, which has been demonstrated to be highly useful for studies of AMF diversity (Stockinger *et al.*, in press, Annex 1).

II. Materials and Methods

A. Sampling and DNA extraction and purification

Among available soil samples from RMQS, soils were filtered for pH ranging from 6 to 7 and two kinds of land use: permanent grassland and arable land. Permanent grasslands were all mowed and grazed and were either initially natural or seeded. Arable lands were with or without grassland intercropping and further this they were either in wheat or in maize cultivation at the sampling date. Over 76 sites corresponding to criteria, 39 were selected in this study. Each soil sample was a composite sample of five soil cores (20 cm depth), roughly homogenized: four cores describing a square of one meter side length and one core in the centre of the square (https://www.youtube.com/watch?v=_k7BEInBXEc). Soil samples were sieved using a 4 mm mesh and stored at -20 °C until DNA extraction.

Soil genomic DNA was extracted from 1 g of each soil sample according to the protocol described in (Plassart *et al.*, 2012) used by Genosol plateforme and freely available at http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/sites/default/files/protocoles/extraction-adn.pdf.

DNA extracts were purified in two steps. First, DNA was loaded onto polyvinylpolypyrrolidone minicolumns (BIORAD, Marne-la-Coquette, France) acentrifugated at 1,000 g for 2 min at 10 °C and the eluate purified using the GeneClean turbo kit (Q-Biogene, Illkirch, France) according to http://www2.dijon.inra.fr/plateforme_genosol/sites/default/files/protocoles/purification-adn.pdf.

B. PCR amplification and pyrosequencing

Soil samples were prepared for 454-pyrosequencing in a two-step PCR procedure in order to amplify part of RPB1 used as gene marker. A first PCR was performed using 0.02 U/μl Phusion polymerase (Thermo-Scientific, Illkirch, France), 1 μl genomic DNA, 1 x Phusion HF Buffer, 0.5 μM of each primer (RPB1-HSm375-mix7 and RPB1-

1210r, Stockinger *et al.*, in press, Annex 1, Supplementary Table 3.1) 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µg/µl BSA, 3 % DMSO in a total volume of 20 µl. Cycling parameters were: 30 s at 98 °C, 35 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 61 °C and 30 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C on an Eppendorf Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Germany). Success of amplification was checked on 1 % agarose gels. For each sample, the DNA extract, the three PCR products, with a size around 1,100 bp, were pooled and purified using a High Pure PCR kit (Roche, Basel, Switzerland). Purified PCR products were diluted 1:10 in sterile filtered water (Eurobio, Courtaboeuf, France) and then used as template in the second step of the nested PCR.

In order to add the MID (a 10 bp barcode for post-sequencing sample identification, Supplementary Table 3.1), a short nested PCR was performed using 0.02 U/µl Phusion polymerase, 1 µl of diluted purified PCR product, 1 x Phusion HF Buffer, 0.5 µM of each primer (RPB1-DR160f-mix10 and RPB1-1210+MID, Table 4.1), 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µg/µl BSA, 3 % DMSO in a total volume of 20 µl. Cycling parameters were 30 s at 98 °C, 10 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 64 °C, 30 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C. We obtained PCR products of around 700 bp for each sample. Again, PCR products were purified with the same Roche kit. Final amplicons were quantified using the Quant-iT™ Picogreen® dsDNA Assay kit (Invitrogen, Life Technologies, Saint-Aubin, France) and mixed equimolarly in two libraries of 24 MID. 454-pyrosequencing was performed on a 1/4th plate by Beckman Coulter Genomics (Grenoble, France) on a 454 GS FLX Roche instrument. Raw data were submitted to the European Nucleotide Archive under the reference ID (accession number pending).

C. Sequence analyses and OTU determination

Raw data were mainly analyzed using the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) pipeline (Caporaso *et al.*, 2010b). Raw data were split by barcode (MID) in each library. Primer and MID sequences were removed. Sequences were filtered by quality (25) and length thresholds (200 bp). Sequences having ambiguous bases were removed. Sequences were aligned using PyNAST (Caporaso *et al.*, 2010a) at 60 % similarity with a reference alignment. Unaligned sequences were discarded. Sequences were clustered at 99.7 % similarity using USEARCH (Edgar, 2010) in order to perform a UCHIME de novo chimera search on clusters by barcode (Edgar *et al.*, 2011). MACSE (Ranwez *et al.*, 2011) was used to denoise sequences at the amino-acid level. Using CROP (Hao *et al.*, 2011), an Operational Taxonomic Unit (OTU) search with a cutoff of 99.2 % sequence similarity was performed (Stockinger *et al.*, in press, Annex 1). OTUs were assigned to a reference tree, as previously described (Stockinger *et al.*, in press, Annex 1), based on sequences available in public database (see Peyret-Guzzon *et al.*, submitted, Chapter 2, Supplementary Figure 2.2). Two assignation methods were used firstly in QIIME, using the RDP naïve Bayesian Classifier method (Wang *et al.*, 2007); secondly it was confirmed using the EPA algorithm of RAXML (Berger and Stamatakis, 2011). OTUs with the same taxonomic assignation were grouped in Molecular Taxa (MTs). When assignation methods were in disagreement, the assignation was set to a taxonomic sublevel and grouped. These genus-level MTs were named according to the family, followed by “gp” and a numeral (*e.g.* “*Glomeraceae gp2*”). The glomeromycotan classification used is the one proposed by (Redecker *et al.*, 2013). Subsequently, singletons and non-glomeromycotan clusters were removed for further analysis.

Table 4.1: Details for all Primers used and MID sequences used in the 454 studies.

RBP1-DR1210r	
ATGACCCATCATTGACATTTTGTG	

RBP1-HS375-mixf-7	
Primer name	Primer sequences
RBP1-m375_A	GCCTTCGCGCTGTTTGG
RBP1-m375_B_wobbel	GTCTTCGYCGGTATGG
RBP1-m375_C	CGTAGACTCAAGGCTGTATGG
RBP1-m375_D	CCGTCTCAAAGCTGTATGG
RBP1-m375_E	TCGTCTCCGTGCAGTATGG
RBP1-m375_F	TCGACTCATAGCTGTGTGG
RBP1-m375_G	CGTCTTCGTGCAGTTTGG

RBP1-DR160f-mix10	
Primer name	Primer sequences
RBP1_DR160FM	CGTCCAAGTATACAAGTTGATGG
RBP1-DR160FA	CCSAGTATTCAAATGGAYGG
RBP1-DR160FB	CCAAGCATCCAAATGGACGG
RBP1-DR160FC	CCAAGTATACAAATGGATGG
RBP1-DR160FD	CCGAGTATTCAGATGGACGG
RBP1-DR160FF	CCAAGCATTCAAATGGACGG
RBP1-DR160FG	CCGAGTATCCAAATGGATGG
RBP1-DR160FH-LO	CGTCCTAGTATACTTATGGATGG
RBP1-DR160FI	CCTAGCATCCAAATGGATGG
RBP1-DR160FK	CCCAGTATATTAATGGACGG

MIDs					
name	sequence	name	sequence	name	sequence
1	ACGAGTGCGT	9	TCTCTATGCG	17	TGTACTACTC
2	ACGCTCGACA	10	TGATACGTCT	18	ACGACTACAG
3	AGACGCACTC	11	CATAGTAGTG	19	CGTAGACTAG
4	AGCACTGTAG	12	CGAGAGATAC	20	TACGAGTATG
5	ATCAGACACG	13	ATACGACGTA	21	TACTCTCGTG
6	ATATCGCGAG	14	TCACGTACTA	22	TAGAGACGAG
7	CGTGTCTCTA	15	CGTCTAGTAC	23	TCGTGCTCG
8	CTCGCGTGTC	16	TCTACGTAGC	24	ACATACGCGT

D. Statistical analysis data

To determine whether sampling intensity was sufficient, OTU and genus-level MT accumulation curves were generated using EstimateS software v.9 (Colwell, 2013). Variations in AMF community composition at the OTUs and genus-level MTs were visualized using non-metric multi-dimensional scaling (NMDS) using the vegan package (Oksanen *et al.*, 2013) of R software. As the stress value in two dimensions was around 0.2, additional ordinations were performed in three dimensions (stress value of 0.14). Environmental properties and factors were fitted to NMDS ordinations with 10,000 permutations in two and three dimensions. Principal observed samples grouping and environmental variables were tested with the analysis of similarity (ANOSIM) using the vegan package of R software (R development core team, 2013). Effects of factors and environmental variables on alpha diversity, expressed by Shannon index calculated on OTUs were tested by two way analysis of variance (ANOVA) and linear model using the vegan package (Oksanen *et al.*, 2013) and the stats package of R software. Indicator OTUs and indicator genera were identified using the indicspecies package (De Cáceres and Jansen, 2013) of R software. Only significant indicators having both specificity and sensitivity values higher than 0.75 were kept. Correlations among AMF community distance matrices and geographic distance matrices among samples were performed using Mantel tests of the vegan package in R software.

III. Results

A. Sequences, OTUs, MTs diversity and richness

After sequence denoising and singleton removing, 121,074 sequences were available, corresponding to 144 Operational Taxonomic Units (OTUs), which were assigned to 18 genus-level Molecular Taxa (MTs). As the number of sequences per sample was highly variable, sub-sampling was performed at several thresholds (500, 1,000, 1,600 and 2,000 sequences, see Table 4.2). Accumulation curve analyses (Figure 4.1) of each sample based on OTUs or genus-level MTs indicated that sampling effort of 1,000 sequences was sufficient to obtain the majority of AMF OTUs and MTs. Therefore, prior to statistical analyses, the number of sequences reads per sample was standardized by OTU sub-sampling to a 1,000-sequence threshold, which was determined by the OTU and genus-level MT accumulation curve analyses (Figure 4.1, Table 4.3) Hence, further results will be presented at this threshold, which allowed to include 30 samples (Figure 4.2), distributed across Northern France with a few ones in the Mediterranean region (all of the grasslands).

Alpha diversity, expressed by the Shannon index based on OTUs, was significantly higher in permanent grasslands than in arable fields samples according to nested ANOVA (Table 4.4, Figure 4.3). This difference of diversity between land use types was strongly shaped by a difference of diversity between samples from seeded grassland and arable fields (Table 4.4, Figure 4.3). In addition, a significant additive effect on the AMF OTU diversity of soil pH was found (Table 4.4) meaning that initial pH as well as land use practices have a massive effect on AMF diversity as 57 % of overall variability of AMF diversity is explained.

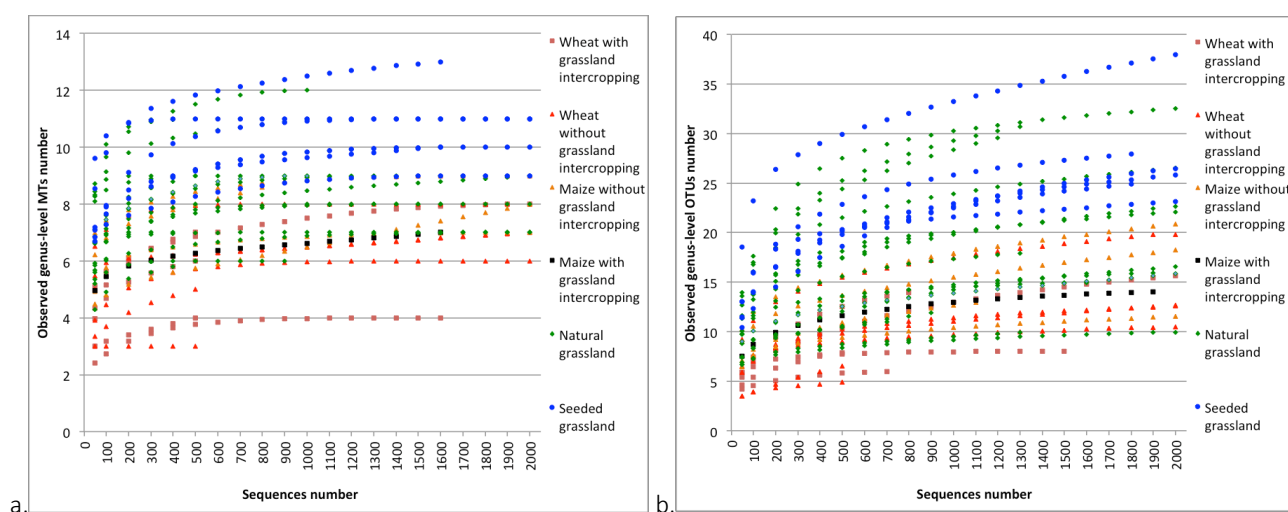


Figure 4.1: Accumulation curves analyses based both on OTUs (a.) and genus-level MTs (b.) of the 39 samples of the study and performed in EstimateS software.

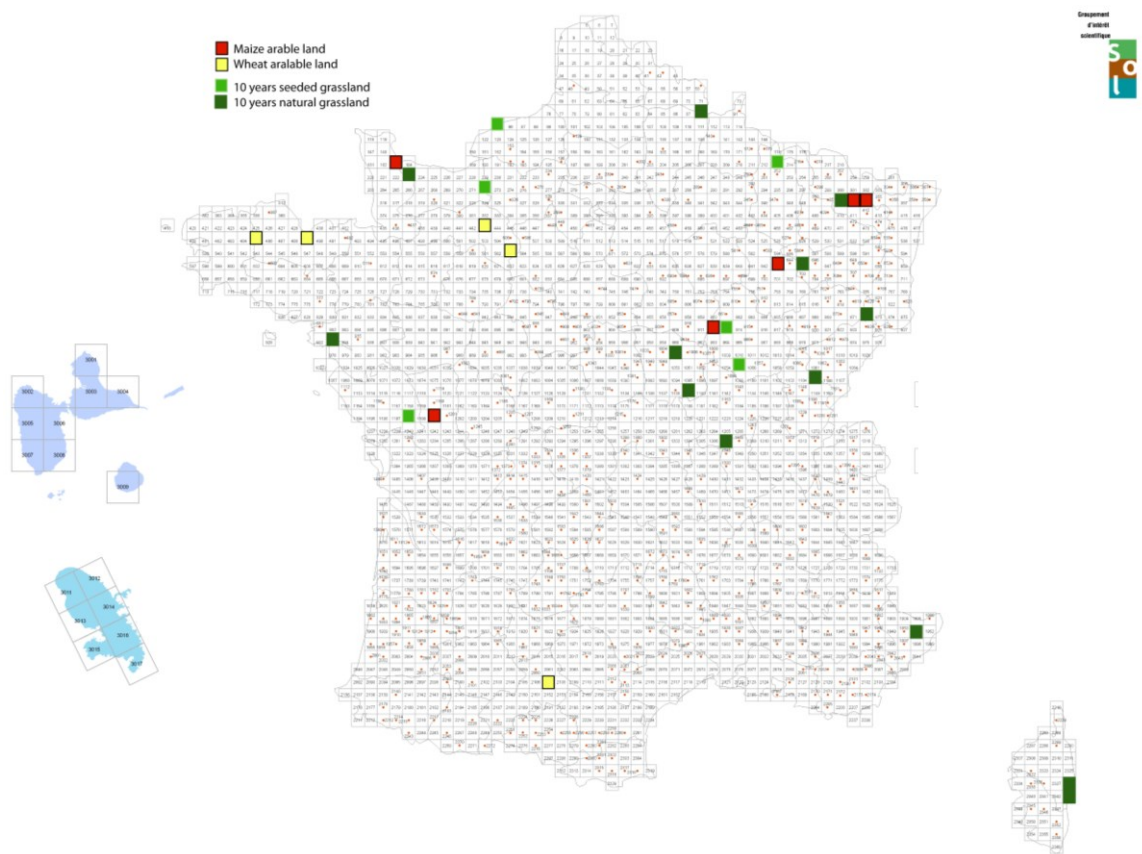


Figure 4.2: Geographic position of samples after subsampling at 1,000 sequences.

Table 4.2: Summary table of number of samples, OTUs and MTs after subsampling to the four thresholds: 500, 1,000, 1,600 and 2,000 sequences.

Samples	Sample name	After rarefactions							
		at 500 sequences		at 1000 sequences		at 1600 sequences		at 2000 sequences	
		Numbers of OTUs	number of MTs	Numbers of OTUs	number of MTs	Numbers of OTUs	number of MTs	Numbers of OTUs	number of MTs
10 years natural grassland	302	13	7	15	8	15	7	na	na
10 years natural grassland	316	10	6	10	6	na	na	na	na
10 years natural grassland	318	22	9	24	10	27	9	24	9
10 years natural grassland	319	26	10	28	11	na	na	na	na
10 years natural grassland	320	18	8	18	8	21	9	23	9
10 years natural grassland	321	18	9	18	10	21	9	22	10
10 years natural grassland	322	8	7	8	7	8	6	8	7
10 years natural grassland	401	18	9	na	na	na	na	na	na
10 years natural grassland	403	12	8	13	7	15	7	16	8
10 years natural grassland	404	13	7	14	7	15	7	15	7
10 years natural grassland	405	11	7	na	na	na	na	na	na
10 years natural grassland	406	16	9	na	na	na	na	na	na
10 years natural grassland	407	24	11	25	12	na	na	na	na
10 years natural grassland	408	10	6	na	na	na	na	na	na
10 years natural grassland	409	15	6	16	9	na	na	na	na
10 years natural grassland	410	26	10	29	12	29	11	28	11
10 years natural grassland	423	13	7	12	8	15	8	15	9
10 years seeded grassland	411	19	6	20	10	20	8	23	9
10 years seeded grassland	412	20	9	22	11	25	10	25	11
10 years seeded grassland	413	29	11	31	11	33	11	35	11
10 years seeded grassland	414	18	9	21	10	21	10	na	na
10 years seeded grassland	415	16	9	23	10	23	10	23	10
10 years seeded grassland	424	22	10	25	12	25	13	na	na
Maize with grassland rotation	420	11	6	11	6	14	7	na	na
Maize without grassland rotation	312	10	7	10	7	10	6	10	7
Maize without grassland rotation	313	15	10	19	11	18	8	19	9
Maize without grassland rotation	314	10	7	13	9	na	na	na	na
Maize without grassland rotation	315	13	7	14	6	19	8	19	8
Maize without grassland rotation	422	8	7	11	7	12	6	12	7
Wheat with grassland rotation	301	10	7	14	7	16	6	16	8
Wheat with grassland rotation	307	8	4	7	3	8	4	na	na
Wheat with grassland rotation	308	4	3	na	na	na	na	na	na
Wheat with grassland rotation	419	8	6	na	na	na	na	na	na
Wheat without grassland rotation	303	6	5	na	na	na	na	na	na
Wheat without grassland rotation	305	16	9	17	9	19	7	17	8
Wheat without grassland rotation	306	9	6	11	6	12	6	13	6
Wheat without grassland rotation	310	5	4	na	na	na	na	na	na
Wheat without grassland rotation	311	10	6	10	7	12	6	12	7
Wheat without grassland rotation	417	12	7	na	na	na	na	na	na
Total number of samples		39		30		25		20	

Table 4.3 : Distribution of genus-level MTs across samples. Numbers of sequences found in each genus-level MTs after subsampling to a 1,000 sequence threshold are indicated. Numbers in brackets correspond to the OTUs within each genus-level MT.

Site number	Climate	Region	Land use	Land use practice	Plant	Genus-level MTs (number of OTUs)																	
						<i>Ambispora</i> (1)	<i>Archaeospora</i> (8)	<i>Acaulospora</i> (2)	<i>Diversispora</i> (5)	<i>Cetranspora</i> (1)	<i>Gigaspora</i> (1)	<i>Claroidaeoglomus</i> (25)	<i>Funneliformis</i> (8)	<i>Glomeraceae gp1</i> (16)	<i>Glomeraceae gp2</i> (5)	<i>Glomeraceae gp3</i> (1)	<i>Glomeraceae gp4</i> (3)	<i>Glomus</i> (6)	<i>uncertain Glomus2</i> (1)	<i>Rhizophagus</i> (6)	<i>Sclerocystis</i> (3)	<i>Septoglossum</i> (5)	<i>Paraglossum</i> (6)
1200	oceanic	Poitou-Charentes	Culture	with grassland	Maize	0	50	0	0	0	0	4	32	418	0	0	0	0	0	190	0	0	306
563	oceanic	Basse-Normandie	Culture	with grassland	wheat	0	669	0	3	0	0	151	0	8	0	0	0	0	51	0	25	93	
489	oceanic	Bretagne	Culture	with grassland	wheat	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	186	7	0	807	
183	oceanic	Basse-Normandie	Culture	without grassland	Maize	0	1	0	0	0	0	69	43	59	0	0	0	0	24	436	0	0	368
912	semi-continental	Bourgogne	Culture	without grassland	Maize	0	0	0	0	0	0	294	12	201	0	0	0	1	0	108	0	0	384
643	semi-continental	Champagne Ardennes	Culture	without grassland	Maize	0	302	0	23	0	0	1	87	340	0	0	1	0	0	102	11	0	133
354	semi-continental	Lorraine	Culture	without grassland	Maize	0	1	0	0	0	0	298	53	144	5	0	1	2	37	111	0	82	266
353	semi-continental	Lorraine	Culture	without grassland	Maize	0	0	0	2	0	0	540	16	338	0	0	0	0	0	50	0	29	25
443	oceanic	Basse-Normandie	Culture	without grassland	wheat	0	83	0	1	0	0	294	48	62	391	0	8	0	0	9	0	0	104
485	oceanic	Bretagne	Culture	without grassland	wheat	3	0	0	7	0	0	494	12	215	0	0	0	0	0	269	0	0	0
2107	oceanic	Midi-Pyrénées	Culture	without grassland	wheat	0	0	0	0	0	0	115	72	8	0	0	1	0	0	272	0	26	506
2338	mediterranean	Corse	Grassland	Natural	Natural	0	341	0	2	0	0	71	0	221	139	0	48	0	0	83	0	3	92
2343	mediterranean	Corse	Grassland	Natural	Natural	0	33	10	0	0	0	60	5	89	600	0	38	15	0	43	65	21	21
1951	mediterranean	Provence-Alpes-Côte-d'Azur	Grassland	Natural	Natural	0	36	0	2	0	0	299	127	70	311	0	33	14	0	28	2	9	69
223	oceanic	Basse-Normandie	Grassland	Natural	Natural	0	66	0	2	0	0	150	0	175	177	0	106	131	0	46	2	0	145
88	oceanic	Nord-Pas-de-Calais	Grassland	Natural	Natural	0	287	0	0	0	0	101	0	148	0	0	0	0	0	164	9	0	291
933	oceanic	Pays de la Loire	Grassland	Natural	Natural	0	27	0	0	0	0	0	0	385	0	0	0	35	129	0	3	67	354
1139	semi-continental	Bourgogne	Grassland	Natural	Natural	0	9	0	0	4	0	14	86	105	0	0	0	557	0	0	0	0	225
1005	semi-continental	Bourgogne	Grassland	Natural	Natural	0	327	0	0	0	0	227	0	132	2	0	42	0	0	24	0	131	115
1307	semi-continental	Bourgogne	Grassland	Natural	Natural	0	0	0	0	0	0	214	7	41	501	0	60	0	0	12	0	0	165
872	semi-continental	Franche-Comté	Grassland	Natural	Natural	0	206	0	0	0	0	578	5	22	3	0	100	3	0	0	12	8	63
1105	semi-continental	Franche-Comté	Grassland	Natural	Natural	0	183	0	2	0	0	639	33	54	0	0	33	0	0	0	0	8	48
352	semi-continental	Lorraine	Grassland	Natural	Natural	0	21	0	1	0	0	185	13	127	54	0	289	160	0	48	0	5	97
645	semi-continental	Lorraine	Grassland	Natural	Natural	0	50	0	0	0	0	170	0	331	300	0	48	0	0	2	0	14	85
272	oceanic	Basse-Normandie	Grassland	seeded	seeded	0	114	0	0	0	0	126	49	330	12	0	109	41	0	57	16	50	96
95	oceanic	Haute-Normandie	Grassland	seeded	seeded	0	46	0	0	0	0	234	6	42	294	0	45	126	7	0	0	4	196
1198	oceanic	Poitou-Charentes	Grassland	seeded	seeded	0	75	0	0	0	0	405	9	208	1	18	64	85	0	4	5	49	77
913	semi-continental	Bourgogne	Grassland	seeded	seeded	0	185	0	1	0	0	350	0	50	0	0	26	4	0	54	52	11	267
1055	semi-continental	Bourgogne	Grassland	seeded	seeded	0	59	0	1	0	301	125	2	60	0	0	49	230	0	0	2	0	171
213	semi-continental	Lorraine	Grassland	seeded	seeded	0	18	0	0	0	0	370	0	28	283	0	117	2	3	19	7	1	152

Table 4.4: Nested ANOVA and ANCOVA results of land use and cultural practices within land use type effects on Shannon diversity index based on OTUs.

ANOVA	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Land use	1	2.0927	2.0927	18.826	0.00019
Practices within land use	2	0.9267	0.4634	4.168	0.026901
Residuals	26	2.8902	0.1112		

ANCOVA	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Practices within land use	3	3.01945	1.00648	11.6477	5.75 e-05
pH	1	0.72989	0.72989	8.4468	0.007553
Residuals	26	2.16026	0.08641		

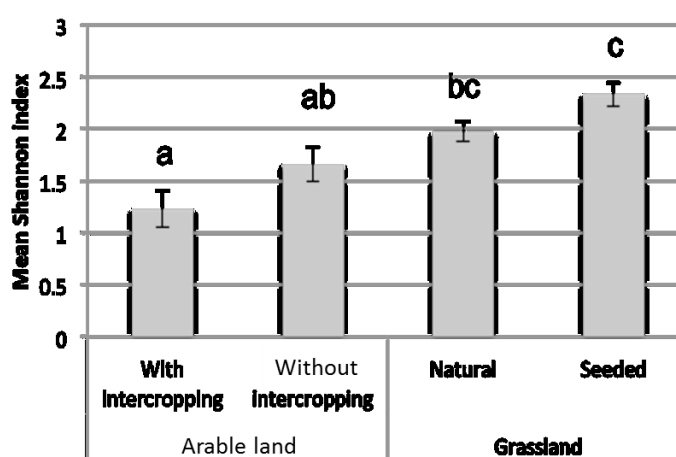


Figure 4.3: Bar chart of mean alpha diversity, expressed by the Shannon index calculated based on OTUs, across to land use type (arable land vs. permanent grassland) and agricultural practices within land use type according to ANOVA and Kruskal-Wallis post hoc test. Error bars represent standard error.

B. AMF communities composition shifts among sampling sites

NMDS ordinations performed using Bray-Curtis distance matrices based on OTUs or genus-level MTs revealed similar patterns, hence only the most informative of them is presented in the Figure 4.4. Two distinct groups of AMF community structures can be observed corresponding to land use type (e.g. grey polygons in Figure 4.4) which was confirmed by ANOSIM results ($R: 0.305$, $P: 0.001$). In addition, a grouping of samples according to cultural practices within arable fields was observed in NMDS ordination especially in the one performed in three dimensions. According to NMDS analyses (Figure 4.4), some environmental parameters were significantly linked to the ordination space of AMF composition. Among all parameters analyzed, pH, carbon content (highly correlated with total content of nitrogen) and extractable content of calcium and chrome were significantly fitted.

Mantel tests showed that AMF community structure was not statistically explained by sample geographic distances at the genus MT level whereas at the OTU level, a significant positive correlation was found ($R: 0.161$, $P: 0.018$). At the genus MT level, regional and climatic information were not identified as significantly impacting AMF community composition in the NMDS analyses even if the influence of the factor "region" was close to the

significant threshold value (P : 0.053), whereas at the OTU level, a significant effect of climatic area was found (P : 0.027), an effect probably driven by the few but distinct three Mediterranean grassland samples.

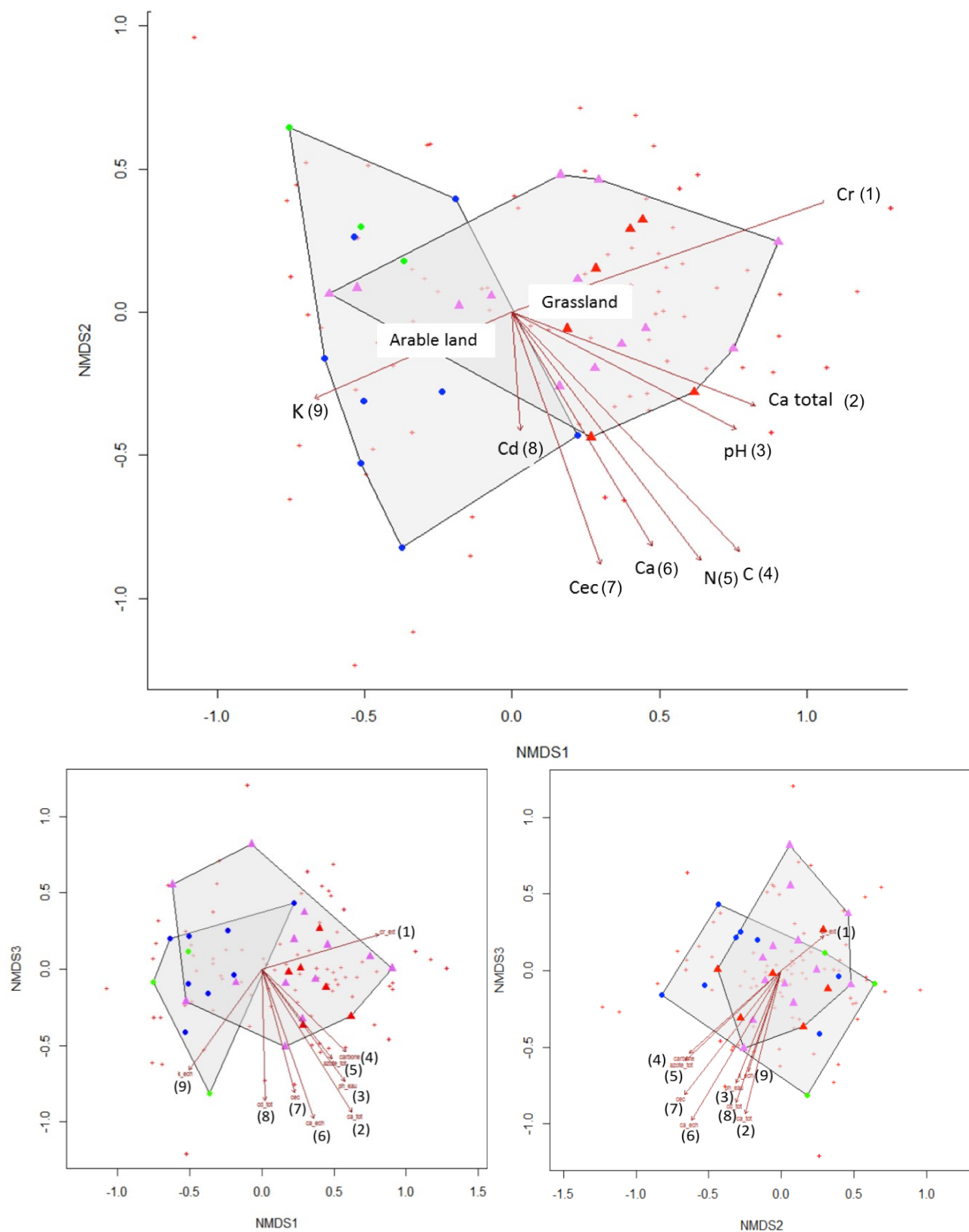


Figure 4.4: Three-dimensional Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) analysis based on a Bray-Curtis abundance distance matrix of OTUs. Colours correspond to cultural treatments within land use type: arable fields (circles) without intercropping (in blue) or with grassland intercropping (in green), or permanent grasslands (triangles) natural (in pink) or seeded (in turquoise). Brown arrows correspond to significantly fitted environmental parameters in the ordination. Red crosses correspond to OTUs.

Some OTUs and genus MTs were identified as indicators for treatments tested. Genus indicator analysis identified *Rhizophagus* (P : 0.032) as typical for culture soil samples and *Glomus* (P : 0.033) and *Glomeraceae gp4* (P : 0.003) as preferentially found in grassland soil samples. At the OTU level, *Rhizophagus otu1* (P : 0.002) was found to be typical for culture with grassland intercropping, whereas for culture without grassland intercropping, *Funneliformis caledonium* (P : 0.004) seems to be characteristic. *Glomeraceae gp4 otu1* (P : 0.002) was identified as indicator for grassland samples.

IV. Discussion

In this study, which is the first one addressing AMF diversity based on a broad sampling across France, AMF communities were investigated using pyrosequencing of a molecular marker of the RNA polymerase II large subunit gene (RPB1), a novel molecular marker recently developed in our group (Stockinger *et al.*, in press, Annex 1). Accumulation curves analysis based on OTUs and genus-level MTs suggested that the sampling effort in the different samples was sufficient at 1,000 sequences threshold.

In a meta-analysis of 18S SSU sequences, Kivlin *et al.* (2011) concluded that “Dispersal limitation, host plant communities, and other environmental factors could contribute to the high variability of AMF between sites. Furthermore, environmental filtering and dispersal limitation seemed to influence local AMF community assembly patterns.” The present study addresses the question of the variability of AMF communities in the context of agriculturally-used soils across France.

Several studies at the local, national or the global scales were conducted to understand AMF community structuration (Jansa *et al.*, 2002 ; Opik *et al.*, 2006 ; Jansa *et al.*, 2014 ; Pellissier *et al.*, 2014 ; Thonar *et al.*, 2014), however, this study is the first one to address AMF diversity across agricultural sites in various French regions. Our results highlight that differences of both AMF diversity and community were firstly structured by land use type. This result is largely in accordance with some previous studies showing the major influence of land use type on AMF community both at the global scale (Öpik *et al.*, 2010) and the small scale (Jansa *et al.*, 2002; see also Peyret-Guzzon *et al.*, submitted, Chapter 2; Peyret-Guzzon *et al.*, in preparation, Chapter 3). In a study based on a broad sampling across Ireland and using T-RFLP to characterize AMF communities, Hazard *et al.* (2012) came to the conclusion that AMF community composition was influenced by abiotic variables (pH, rainfall and soil type), but not by land use or geographical distance. A similar question as in our study was addressed by Thonar *et al.* (2014) in field sites in Switzerland, however using a different methodology; these authors used qPCR to quantify six selected AMF species in bait plants cultivated in 154 soil samples taken from all over Switzerland. The relative abundances of these taxa were used to obtain community profiles. Their results showed strong effects of pH, soil fertility and texture, as well as altitude and large geographical distance. Unexpected to the authors was the apparent lack of a strong land management effect on the AMF communities as compared to the other predictors, with not a single indicator species for land use. The authors attributed this situation to the “rarity of highly intensive and unsustainable land management in Swiss agriculture”. As in the study of Hazard *et al.* (2012), however ho analyzed root directly sampled from the field only for a subset of their fiel sites (all pastures), it also seems possible that the land use effect is masked by the bait plant procedure here. Setting up bait cultures in the greenhouse inevitably

involves soil disturbance, which is known to be the most prominent factor in agriculture influencing AMF communities (see Chapters 2 and 3). In addition, OTUs not assignable to known taxa have been identified as indicators in our study, which evidently was impossible using the approach by Thonar *et al.* (2014). As the present sampling was designed to primarily allow analysis of the factors land use, agricultural practice and geography, we tried to keep soil pH as constant as possible, as its effects on bacterial (Dequiedt *et al.*, 2011), fungal (Pellissier *et al.*, 2014) or AMF community (Jansa *et al.*, 2014) are well known. However, even with a low gradient of pH (from 6 to 7), this factor came up as a significantly fitted environmental vector in NMDS and had a significant effect additional to land-use type on AMF community alpha diversity.

In a recent study of fungal diversity using pyrosequencing in a large number of field sites in Western Switzerland, Pellissier *et al.* (2014) detected significant influence of geographic distance across this heavily structured landscape. These authors also highlighted the specific situation of plant-associated fungi, which may follow the distribution of their host plants. Our data do not indicate significant structuring across the northern half of France, which is climatically diverse, but shows a less pronounced topology. In contrast, our Mediterranean samples are clearly different, which is however more likely driven by habitat differences. Those results should incite large-scale studies working on biogeographical climatic effects on AMF community distribution as suggested by the study of Kivlin *et al.* (2011).

NMDS also highlighted the correlated variables of carbon content and total nitrogen content as significant explanatory environmental factors of AMF community composition dissimilarity (Figure 4.2) and unexpectedly, extractable chrome or potassium concentrations (Figure 4.2). An increase of soil nitrogen content as well as carbon content has been previously identified as explanatory factor of AMF community comparing samples from those different land use types (Peyret-Guzzon *et al.*, in preparation, Chapter 3).

Our analysis also underlines the need for high taxonomic resolution to identify geographical patterns as we did not detect a significant effect at the genus level. Therefore the resolution of T-RFLP of an 18S region (Hazard *et al.*, 2012) might not be sufficient to pick up the differences between the sites.

One unknown *Rhizophagus* (otu1) was identified as indicator for arable sites at the OTU level. This result is interesting as species of the genus *Rhizophagus*, especially *Rhizophagus irregularis*, which was the predominant species of the genus in this study, is reported as tolerant to hyphal network disruption (Öpik *et al.*, 2006, Peyret-Guzzon *et al.*, in preparation, Chapter 3) and discussed to be a generalist (Sykorova *et al.*, 2007, Peyret-Guzzon *et al.*, submitted, Chapter 2).

The OTU *Funnelformis caledonium* was found to be more abundant in culture samples which is in accordance with the colonizer life history strategy of the genus *Funnelformis* previously been reported in numerous studies (Jansa *et al.*, 2002; Sykorova *et al.* 2007; Jansa *et al.*, 2008; Peyret-Guzzon *et al.*, in preparation, Chapter 3).

The MT *Glomeraceae gp4* was pinpointed as genus-level indicator genus for grasslands, but its taxonomic affiliation remains unclear and merits further investigation in order to better understand ecological functioning of this group in the AMF community. The same is true for *Glomeraceae gp2*. Deeply-diverging lineages in the

Glomeraceae such as these two are numerous in environmental sequencing studies, even in 18S rDNA small subunit-based studies with a better-populated database.

Conclusion

This study, using high throughput sequencing technology of a novel molecular marker, provides an unprecedented insight into AMF communities at the French national scale. Our results highlight the predominant effect of land use type and cultural practices in our data set as well as an unexpected effect of a small gradient of pH. No compelling evidence for dispersal limitation at the scale studied was found, *i.e.* distance effects were apparently primarily due to habitat or climate differences.

Acknowledgments

The authors would like to thank the regional council of Burgundy for its grant (FABER program n° 2010-9201AAO047S01404). The authors are thankful for comments to Diederik van Tuinen.

Conclusion du Chapitre 4

Dans le Chapitre 4, nous avons pu montrer que même à l'échelle nationale, le type d'usage de sol est un facteur important dans la structuration des communautés de CMA. Nous avons souligné l'importance de la prise en compte des pratiques culturales dans la compréhension de la dynamique d'établissement et de maintien des communautés de CMA et ce à l'échelle du nord de la France. Enfin, nous avons mis en évidence l'impact du pH sur la structuration des communautés de CMA même lorsque celui-ci est contenu. Enfin, aucune preuve de limitation de la dispersion à l'échelle étudiée n'a été trouvée puisque les effets des distances géographiques observées semblent être principalement due aux différences d'habitat ou aux différences climatiques.

Références bibliographiques du Chapitre 4

- Barrios E (2007) Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* 64:269-285. DOI: 10.1016/j.ecolecon.2007.03.004
- Baas-Becking LGM (1934) Geobiologie of inleiding tot demilieukunde. Van Stockum & Zoon, The Hague. 263p.
- Berger SA and Stamatakis A (2011) Aligning short reads to reference alignments and trees. *Bioinformatics* 27: 2068-2075. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr320
- Börstler B, Thiéry O, Sýkorová Z, Berner A, Redecker D (2010) Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497-1511. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04590.x
- Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, De Santis TZ, Andersen GL, Knight R (2010a) PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26: 266-267. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp636
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. (2010b) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335-336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303
- Colwell RK (2013) EstimateS, Version 9.1.0: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples. <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/>.
- Dai M, Bainard LD, Hamel C, Gan Y, Lynch D (2013) Impact of land use on arbuscular mycorrhizal fungal communities in rural Canada. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 6719-6729. DOI: 10.1128/AEM.01333-13
- De Caceres M and Jansen F (2013) Studying the statistical relationship between species and groups of sites. Package indicpecies v 1.7.1. <http://cranr-project.org/web/packages/indicpecies/indexhtml>.
- de la Pena E, Rodriguez-Echeverria S, van der Putten WH, Freitas H, Moens M (2006) Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytologist* 169: 829-840. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01602.x
- Dequiedt S, Thioulouse J, Jolivet C et al. (2009). Biogeographical patterns of soil bacterial communities. *Environmental Microbiology Report* 1:251-255. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00040.x
- Dequiedt S, Saby NPA, Lelievre M, Jolivet C, Thioulouse J, Toutain B, Arrouays D, Bispo A, Lemanceau P, Ranjard L (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as Influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography* 20: 641-652. DOI: 10.1111/j.1466-8238.2010.00628.x
- Dumbrell AJ, Nelson M, Helgason T, Dytham C and Fitter AH (2010) Relative roles of niche and neutral processes in structuring a soil microbial community. *The ISME Journal* 4: 325-337. DOI: 10.1038/ismej.2009.122
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460-2461. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq461
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381
- Fitter AH, Helgason T, Hodge A (2011) Nutritional exchanges in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: implications for sustainable agriculture. *Fungal Biology Reviews* 25: 68-72 DOI: 10.1016/j.fbr.2011.01.002
- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet MN, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010) Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20: 519-530. DOI: 10.1007/s00572-010-0333-3
- Gosling P, Proctor M, Jones J, Bending GD (2014) Distribution and diversity of Paraglomus spp. in tilled agricultural soils. *Mycorrhiza* 24: 1-11. DOI: 10.1007/s00572-013-0505-z
- Hazard C, Gosling P, van der Gast CJ, Mitchell DT, Doohan FM, Bending GD (2012) The role of local environment and geographical distance in determining community composition of arbuscular mycorrhizal fungi at the landscape scale. *The ISME Journal* 7: 498-508. DOI: 10.1038/ismej.2012.127
- Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* 14: 2413-2429. DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.004861>
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234. DOI: 10.1007/s00572-002-0163-z

- Jansa J, Erb A, Oberholzer HS, Smilauer P, Egli S (2014) Soil and geography are more important determinants of indigenous arbuscular mycorrhizal communities than management practices in Swiss agricultural soils. *Molecular Ecology* 23: 2118-2135. DOI: 10.1111/mec.12706
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* 37: 1-16. DOI: 10.1007/s00374-002-0546-5
- Johnson D, Anderson IC, Williams A, Whitlock R, Grime JP (2010) Plant genotypic diversity does not beget root-fungal species diversity. *Plant and Soil* 336: 107-111. DOI: 10.1007/s11104-010-0452-9
- Kahiluoto H (2000). A systems approach to the management of arbuscular mycorrhiza—bioassay and study of the impact of phosphorus supply. Thesis. University of Helsinki. DOI: <http://orgprints.org/4059/>
- Kivlin SN, Hawkes CV, Treseder KK (2011) Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 43:2294-2303. DOI: 10.1016/j.soilbio.2011.07.012
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7: 139-153. DOI: 10.1007/s005720050174
- Lozupone C and Knight R (2005) UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 8228-8235. DOI: 10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH *et al.*, (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* 4, 102-112. DOI: 10.1038/nrmicro1341
- Mummey DL and Rillig MC (2006) The invasive plant species *Centaurea maculosa* alters arbuscular mycorrhizal fungal communities in the field. *Plant and Soil* 288: 81-90. DOI: 10.1007/s11104-006-9091-6
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2013) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-9. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Öpik M, Moora M, Liira J, Zobel M (2006) Composition of root-colonizing arbuscular mycorrhizal fungal communities in different ecosystems around the globe. *Journal of Ecology* 94: 778-790. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2006.01136.x
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier U, Zobel M (2010) The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *New Phytologist* 18: 223-241. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x
- Pellissier I, Niculita-Hirzel H, *et al.*, (2014) Soil fungal communities of grasslands are environmentally structured at a regional scale in the Alps. *Molecular Ecology* 23: 4274-4290. DOI: 10.1111/mec.12854
- Peyret-Guzzon M, Stockinger H, Bouffaud ML, Farcy P, Redecker D (submitted) Effects of short-term soil disturbance and fertilization on arbuscular mycorrhizal fungal communities and *Rhizophagus irregularis* populations in a grassland.
- Plassart P, Terrat S, Thomson B *et al.* (2012) Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community Structure. *PLOS ONE* 7: 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0044279
- Plenchette C, Clermont-Dauphin C, Meynard JM, Fortin JA (2005). Managing arbuscular mycorrhizal fungi in cropping systems. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 31–40. DOI: 10.4141/P03-159
- Ranjard L, Dequiedt S, Chemidlin Prévost-Bouré N, Thioulouse J, Saby NPA, Lelievre M, Maron PA, Morin FER, Bispo A, Jolivet C, Arrouays D, Lemanceau P (2013) Turnover of soil bacterial diversity driven by wide-scale environmental heterogeneity. *Nature Communications* 4:134. DOI: 10.1038/ncomms2431
- Ranwez V, Harispe S, Delsuc F and Douzery EJP (2011) MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons. *PLOS ONE* 6: e22594. DOI: 10.1371/journal.pone.0022594
- R development core team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stuermer SL, Morton JB, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23: 515-531. DOI: 10.3852/mycologia.98.6.885
- Rosendahl S, McGee P, Morton JB (2009) Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Molecular Ecology* 18: 4316-4329. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04359.x

- Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Bouffaud ML, Koegel S, Redecker D (2014) The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field. *PLOS ONE* 9(10): e107783. DOI: 10.1371/journal.pone.0107783
- Sýkorová Z, Wiemken A, Redecker D (2007) Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5426-5434. DOI: 10.1128/AEM.00987-07
- Taylor JW, Turner E, Townsend JP, Dettman JR, Jacobson D (2006) Eukaryotic microbes, species recognition and the geographic limits of species: examples from the kingdom *Fungi*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 361, 1947-1963. DOI: 10.1098/rstb.2006.1923
- Thonar C, Frossard E, Smilauer P, Jansa J (2014) Competition and facilitation in synthetic communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 23: 733-746. DOI: 10.1111/mec.12625
- Vigo C, Norman J, Rand Hooker JE (2000) Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology* 49: 509-514. DOI: 10.1046/j.1365-3059.2000.00473.x
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5261-5267. DOI: 10.1128/AEM.00062-07
- Whitaker RJ, Grogan DW, Taylor JW (2003) Geographic barriers isolate endemic populations of hyper-thermophilic *Archaea*. *Science* 301: 976-978. DOI: 10.1126/science.1086909

Chapitre 5

Discussion générale et perspectives

Actuellement, les besoins alimentaires mondiaux ne cessent d'augmenter et la production agricole doit croître en conséquence. Dans un même temps, la politique agricole commune française et européenne actuelle vise à réduire l'empreinte de l'Homme sur les écosystèmes agricoles en imposant la réduction des intrants tout en maintenant une haute productivité, préservant ainsi la qualité des sols et de ce fait leur biodiversité. Plus de 50 % du territoire métropolitain français est occupé par des terres agricoles (*Agreste Primeur*, Avril 2011, http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_primeur260.pdf) et la France est, à l'heure actuelle, la première puissance agricole européenne avec 18,7 % de part de marché (*Le Figaro*, 7 janvier 2014), comme l'atteste la Figure 5.1. La large gamme de bénéfices rendus aux plantes par les CMA ainsi que leur rôle clé dans le fonctionnement des écosystèmes et dans la fertilité du sol, font d'eux des outils à promouvoir en agriculture durable. Afin de développer des instrumentations adaptées pour utiliser leurs services écosystémiques, il est crucial de comprendre les mécanismes qui gouvernent les relations symbiotiques entre plantes et CMA. Au cours de ce travail de recherche, nous avons apporté des connaissances supplémentaires sur la structuration des CMA dans les agroécosystèmes qui sont sous l'influence de pratiques culturales variées. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur la structuration de la diversité populationnelle des CMA mais aussi sur la structuration de leur communauté dans les agroécosystèmes, au champ. Nos études ont été réalisées d'une part à différentes échelles spatiales, allant de la micro-parcelle à celle nationale et d'autre part, à plusieurs échelles temporelles : à court, moyen et long termes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence les effets qu'engendrent certains types d'usage de sol et certaines pratiques culturales sur la structuration des diversités intra- et interspécifique de CMA. Nous avons pu émettre des recommandations pour le maintien de la diversité des CMA dans ces agroécosystèmes même si un vaste panel d'études est encore à mener afin de gérer les services écosystémiques de ces champignons en conditions extérieures.

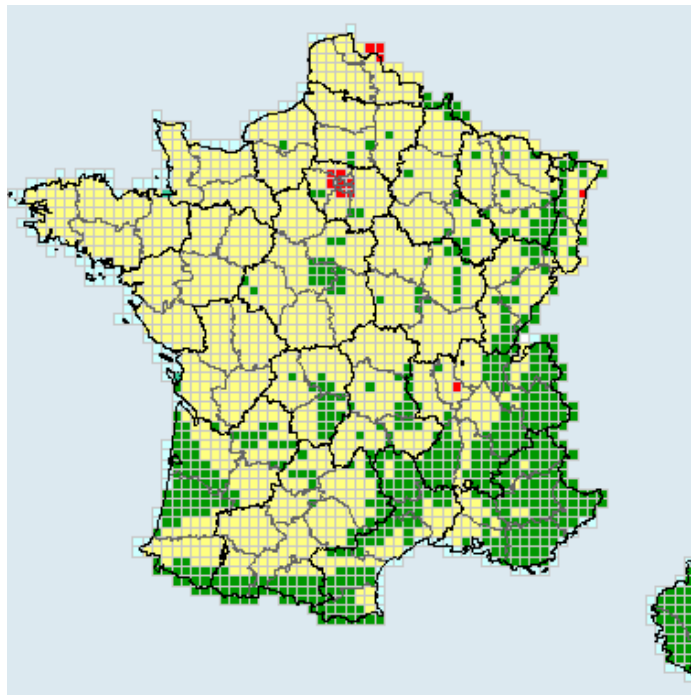


Figure 5.1: Type d'occupation des sols du territoire français selon une grille de 16 km². Source indiquasol : <http://indiquasol.gissol.fr/geoindiquasol/main.php> © INRA, 2014. Sont représentés : en rouge, les territoires artificialisés ; en jaune, les territoires agricoles ; en vert, les forêts et milieux semi-naturels ; en bleu foncé, les zones humides et en bleu clair, les surfaces en eau.

I. Type d'usage de sol

Les résultats des travaux présentés dans les chapitres 2 et 3 de cette thèse ont démontré qu'il existe des différences significatives entre les communautés de CMA selon les types d'usage de sol étudiés, c'est-à dire entre cultures céréalières (maïs et blé) et prairies cultivées (naturelles et semées) et ce, respectivement, à moyen comme à long terme. Ces différences se manifestent autant sur la diversité que sur la composition des communautés de CMA. Ainsi, avons-nous montré que la diversité est plus importante dans les prairies cultivées que dans les champs arables. De plus, nous avons identifié des espèces, des OTUs ou des genres indicateurs des différents types d'usage de sol. En effet, dans le chapitre 2, les prairies cultivées sont caractérisées par la présence de plusieurs espèces appartenant aux genres *Ambispora*, *Archaeospora*, *Claroideoglossum*, *Paraglossum* et *Septoglossum* contrairement aux champs cultivés qui n'en présentent pas. Dans ces derniers, seule une surabondance de l'espèce *Rhizophagus irregularis* dans les racines des cultures a pu être mise en évidence alors qu'une autre espèce non identifiée de *Rhizophagus* semble être plus abondante dans les prairies cultivées. A l'échelle nationale cette fois, les genres *Glossum* et *Glomeraceae gp4* semblent typiques des prairies cultivées tandis que les genres *Rhizophagus* et *Funneliformis* caractérisent les champs cultivés. Malgré ces divergences qui peuvent notamment être imposées par les différences de durée de mise en place des prairies, sept ans contre plus de dix ans), il est intéressant de noter que dans les deux cas, le genre *Rhizophagus* ressort des analyses.

Bien que les champs arables et les prairies cultivées soient tous deux des agroécosystèmes, les pratiques culturales appliquées y divergent.

II. Pratiques culturales

Les pratiques culturales associées aux agroécosystèmes sont très nombreuses et peuvent grandement différer en intensité. Parmi celles-ci, nous nous sommes intéressés aux trois plus connues : le retournement du sol, les fertilisations et les rotations culturales.

A. Retournement du sol

Parmi les pratiques culturales, l'une des plus anciennes et des plus usitées est le retournement du sol par labour mécanique. Cette technique a été reconnue comme la principale cause des modifications des communautés de CMA colonisant les racines des plantes dans les agrosystèmes car ayant un impact négatif sur leur diversité (Jansa *et al.*, 2002). En effet, par ce retournement mécanique répétitif, le réseau mycélien établi dans le sol est morcelé, enfoui et dispersé dans la parcelle, ce qui ralentit non seulement la colonisation des plantes mais aussi l'exploitation des ressources du sol par les CMA qui se retrouvent alors obligés de reformer leurs réseaux (Goss et Varennes, 2002 ; Kabir, 2005). Or, les espèces de CMA ne possèdent pas tous la même capacité à reformer leur mycélium ni la même rapidité de colonisation des racines (Biermann et Lindermann, 1983). Face au labour, les

espèces ayant une stratégie d'histoire de vie de type « r » vont être favorisées comme cela a été reporté pour l'espèce *Funneliformis mosseae* (Sykorová *et al.*, 2007 ; Rosendahl *et al.*, 2008), engendrant un changement dans la structure des communautés de CMA. Les différences de diversité et de composition des communautés de CMA, observées à moyen et long termes, sont probablement majoritairement dus à cette pratique culturale qui est absente dans le cadre de prairies permanentes et au minimum annuelle dans le cadre de culture permanente sans jachère. Cette hypothèse semble confirmée puisque nous avons identifié le retournement du sol comme facteur majeur de la structuration des communautés de CMA à court terme à une échelle spatiale très réduite : celle de la bande enherbée. Grâce à cette étude, il a été possible d'identifier dans les prairies des espèces indicatrices du retournement du sol qui appartiennent aux genres *Funneliformis*, *Glomeraceae gp6* et *Septoglomus*. En plus de ceux-ci, d'autres genres se sont montrés sensibles au retournement du sol comme *Paraglomus*, *Rhizophagus*, *Claroideoglomus* et *Glomeraceae gp2*. De façon surprenante, la diversité des CMA à court terme (Chapitre 2) augmente avec le retournement du sol. Il se pourrait que cette augmentation ne soit que transitoire. En effet, lors du retournement du sol, la végétation est nulle favorisant les premières espèces colonisatrices qui sont alors moins en compétition limitées par l'espace, la lumière ou les nutriments. Les plantes peuvent alors former des systèmes racinaires plus étendus ce qui peut potentiellement favoriser la colonisation racinaire par plus d'espèces de CMA qui elles sont en grande compétition car elles ne sont plus en symbiose active. Par conséquent, il est possible que la diversité des symbiotes actifs ne soit que temporairement augmentée par le retournement de sol. Toujours dans le cadre de l'étude de l'influence du type de pratique culturale « retournement de sol », nous avons aussi conclu du potentiel du labour sur l'assemblage de populations de l'espèce *Rhizophagus irregularis*.

Par conséquent, nous avons montré que le retournement du sol par labour influence l'établissement et le maintien des communautés de CMA, indépendamment des échelles spatiales et temporelles, même si cela est aussi influencé par d'autres pratiques culturales, comme les fertilisations.

B. Fertilisations

Une autre pratique culturale qui a un rôle majeur dans les agroécosystèmes est la fertilisation par ajouts d'engrais minéraux solubles généralement composée d'azote et de phosphore. Celle-ci est dite fondamentale pour la croissance des plantes mais peut aussi s'avérer être une source de pollution des sols et des eaux lorsqu'elle est appliquée de façon abusive. De plus, de nombreuses études ont montré que ces fertilisations à outrance sont néfastes à la mise en place de la symbiose mycorhizienne à arbuscules. En effet, dans les environnements riches en nutriments, la plante peut accéder aux nutriments sans l'aide du CMA, ce qui peut entraîner une perte de diversité des CMA (Egerton-Warburton *et al.*, 2007 ; Alguacil *et al.*, 2010 ; Liu *et al.*, 2012) par le biais d'une réduction de la quantité de sucres allouée par la plante aux CMA (Johnson *et al.*, 2003) augmentant ainsi la compétition entre CMA pour le carbone. De cette façon, des études ont montré que tous les taxons n'avaient pas la même sensibilité aux environnements fertilisés (Jakobsen *et al.*, 1992 ; Oehl *et al.*, 2004 ; Avio *et al.*, 2012). En étudiant ce type de fertilisation, nous avons montré que l'azote et le phosphore varient de façon significative selon le type d'usage de sol et nous avons pu montrer que la fertilisation azotée module, à court terme, l'effet du retournement du sol sur la structuration des communautés de CMA.

C. Rotations culturales

Les rotations culturales jouent aussi un rôle primordial sur la diversité des CMA car la diversité des plantes hôtes au fil des cultures peut y être très grande, comme dans les systèmes de rotations avec jachères, ou très faible, comme dans le cas de monoculture répétées. Cette hypothèse, pour expliquer la perte de diversité des CMA, a déjà été proposée (An *et al.*, 1993; Burrows et Pfleger 2002; Oehl *et al.* 2003 ; Hijri *et al.*, 2006 ; Jiao *et al.*, 2011). En mettant en évidence des variations significatives de la composition des communautés de CMA entre cultures permanentes avec prairies temporaires et cultures permanentes sans ces prairies, nous avons pu faire la même observation. Il a été précédemment reporté que la diversité du couvert végétal influence celle des CMA et inversement (van der Heijden *et al.*, 1998 ; Scheublin *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2010), suggérant des préférences d'associations entre certaines plantes hôtes et certains CMA (Klironomos *et al.*, 2001 ; Pivato *et al.*, 2007). Cette préférence est probablement due aux besoins de la plante et aux capacités symbiotiques du CMA considéré, ceci dans un environnement donné. Certaines plantes cultivées, comme le colza chez les *Brassicaceae*, ne forment pas de symbiose endomycorhizienne à arbuscules. Par conséquent, les rotations culturales avec ce type de plantes devraient être en alternance rapide avec d'autres cultures mycorrhizogènes afin de minimiser la perte de diversité de CMA.

III. Les contraintes de l'expérimentation au champ

Depuis le commencement de ces travaux de thèse, de nombreuses communications scientifiques visant à parfaire la compréhension du fonctionnement des communautés de CMA dans ces agroécosystèmes sont parues. Les résultats, tantôt congruents, tantôt partiellement contradictoires témoignent de la difficulté de la mise en place d'études environnementales aux champs. En effet, mener ce type d'étude requiert de faire face à de nombreuses contraintes, qu'elles soient dues au système expérimental, à l'échantillonnage, à la technique de biologie moléculaire employée ou encore aux outils d'analyses bioinformatiques utilisés.

A. Le système expérimental

Opter pour un système expérimental au champ requiert d'accepter une certaine approximation. En effet, alors qu'en laboratoire, le nombre de variables expérimentales peut être restreint *a minima*, aux champs, il est complexe d'appréhender et de contrôler tous les facteurs externes. Ainsi, s'affranchir par exemple des conditions climatiques est impossible. En conditions externes, étudier l'influence des pratiques culturales est plus complexe car d'autres biais peuvent s'ajouter. Par exemple, l'étude de l'impact des fertilisations s'effectue fréquemment avec des engrais binaires ou ternaires (NK, PK, NPK) rendant l'isolement des effets de chaque fertilisant difficile. De surcroît, le retournement du sol engendre une déstructuration du sol ainsi qu'une élimination du couvert végétal. Ceux-ci affectent la perméabilité du sol à l'eau mais aussi les compétitions existantes entre plantes, que ce soit pour la lumière ou l'espace, pouvant ainsi mener l'expérimentateur à confondre les effets que peuvent engendrer

chacun de ces paramètres. On peut ajouter à cela que d'autres communautés que celles étudiées sont présentes dans le système qu'elles soient fongiques, bactériennes ou fauniques. Celles-ci interagissent forcément avec celle des CMA de façon directe ou indirecte. *A contrario*, les expériences en laboratoire manipulant uniquement des communautés entières de CMA sont, à l'heure actuelle, assez sporadiques voire inexistantes. En effet, il est difficile de cultiver les CMA que ce soit en culture pure dans les collections ou en culture de serre. Par exemple, la culture des génotypes isolés des populations prairiales de l'espèce *Rhizophagus irregularis* ne conduit, à ce jour, qu'à très peu de résultats positifs. Par conséquent, les expérimentations aux champs sont plus proches des conditions réelles d'exploitation agricole que celles en laboratoire menées jusqu'alors mais aucune des deux méthodes ne peut prendre en compte tous les facteurs précités. Ainsi, de nombreuses études sont-elles encore nécessaires aux champs et en laboratoire afin d'obtenir une vue d'ensemble du fonctionnement des différentes communautés en interactions. Cette acquisition aux champs ne pourra se faire qu'en établissant des projets collaboratifs « de grande envergure » alliant des études simultanées des différentes communautés présentes dans le système étudié.

B. L'échantillonnage

L'échantillonnage est aussi une approximation du système étudié puisque les écosystèmes sont dynamiques, tant au niveau biotique qu'abiotique. Des études ont en effet montré une saisonnalité des CMA (Allen *et al.*, 1995 ; Daniell *et al.*, 2001 ; Bainard *et al.*, 2014). Cependant, nous n'avons pas pu clairement mettre en évidence que la date, la saison, le mois ou l'année de prélèvement est un facteur significatif pour la structuration des communautés de CMA. Dans l'absolu, il faudrait pouvoir suivre ces communautés sur des intervalles de temps restreints.

Le type d'échantillon est aussi à prendre en considération. Nous avons présenté des dissemblances et des similitudes entre des échantillons racinaires, en symbiose active, et échantillons de sol, potentiel mycorrhizogène. L'analyse des échantillons de sol au sein des prairies semblent conduire à de meilleures estimations des symbioses actives que celles issues d'échantillons de culture. La littérature reporte des résultats variables quant aux similitudes observée entre communautés issues de chacun de ces deux types d'échantillons, ces disparités étant probablement dues en partie aux traits d'histoire de vie variables entre CMA puisque certains sporulent au sein des racines et d'autres dans le sol. Par conséquent, l'idéal resterait donc une analyse conjointe des deux types d'échantillons.

C. Les techniques de biologie moléculaire

Chaque technique de biologie moléculaire présente des avantages et des biais qui lui sont propres. Le séquençage haut-débit a révolutionné les disciplines scientifiques s'intéressant aux communautés et aux populations, comme l'écologie microbienne. Malgré tout, l'utilisation quantitative des résultats obtenus grâce à cette technique est toujours débattue de par les biais liés à l'amplification du gène cible en PCR, le regroupement des séquences en OTUs et l'assignation d'une taxonomie à chaque OTUs (Hamady et Knight, 2009). Cependant,

dans la mesure où, d'une part, il est difficile de cultiver ces champignons, que ce soit en terme de culture pure ou en terme de culture en serre, et où, d'autre part, certaines espèces décrites manquent de données moléculaires (Redecker *et al.*, 2013), l'exploration de la diversité totale des espèces et populations de CMA est loin d'être terminée (Öpik *et al.*, 2013). De plus, à l'heure actuelle, le séquençage haut-débit ne permet pas d'amplifier de très longs fragments comme le gène marqueur mtLSU. Dès lors, les autres méthodes d'empreintes moléculaires restent fort utiles.

Le gène marqueur constitue aussi une approximation comme a pu le démontrer l'étude récente de Kohout *et al.* (2014) par des distinctions de différentes communautés de CMA selon les fragments et les amorces utilisés. Bien évidemment, un pyroséquençage total de tous les génomes présents dans les racines et les sols serait parfait, mais à l'heure actuelle et au vu de l'investissement financier et humain, une restriction à un ou deux gènes marqueurs fournit une bonne approximation, d'autant plus que nous avons pu observer (chapitres 2 et 4) une bonne cohérence de la structuration des communautés au niveau de l'OTU, de l'espèce ou du genre avec le gène marqueur RPB1 (voir Annexe 1).

D. Les analyses bioinformatiques

A l'heure des techniques de séquençage haut-débit, les analyses bioinformatiques des données par logiciels automatisés n'est pas encore d'actualité bien que des scripts prédéfinis soient en libre accès. Certaines étapes de l'analyse bioinformatique dépendent du gène marqueur choisi, comme la délimitation des OTUs (souvent à 97 %) qui est très souvent déterminé en fonction du pouvoir de résolution spécifique de gène marqueur choisi. « La façon de délimiter les OTUs biaise-t-elle notre perception de l'écologie fongique ? » est une question toujours débattue (Öpik *et al.*, 2008 ; Powell et Sikes, 2014 ; Lekberg *et al.*, 2014). D'autres choix peuvent s'avérer d'une grande importance comme (i) l'échelle de diversité analysée : OTUs (diversité parfois intraspécifique) ou MTs (niveau choisi); (ii) le type de distances phylogénétiques ou taxonomiques ; (iii) le seuil de sous-échantillonnage (standardisation du nombre de séquences par échantillon). Pour pallier à ces soucis, nous avons utilisé une assignation taxonomique parcimonieuse dans tous les résultats présentés dans cette thèse, quitte à avoir des espèces ou des genres non identifiés. Les analyses ont été effectuées à plusieurs seuils de sous-échantillonnages ainsi que sur des distances phylogénétiques et taxonomiques et ont présenté les mêmes résultats. *A fortiori*, l'augmentation et la gestion des bases de données des gènes marqueurs ainsi que le développement de nouveaux marqueurs, outils primordiaux aux analyses bioinformatiques, sont à améliorer et à superviser.

Pour toutes ces raisons, il nous paraît opportun de souligner qu'un consensus international sur les méthodes d'analyses est nécessaire. Une piste à envisager par exemple pour la délimitation des OTUs dans l'étude des communautés de CMA est la définition de seuils spécifiques d'identité ou de similarité pour un marqueur donné.

IV. Etudes à poursuivre

Les études présentées dans ce manuscrit procurent des informations supplémentaires sur la structuration des communautés de CMA dans les agroécosystèmes. Malgré cela, force est de constater qu'il persiste des zones d'ombre qui pourraient partiellement être éclaircies par la poursuite des études engagées mais qui nécessite aussi la mise en place d'autres pistes de recherche.

A. Espèces indicatrices

Au cours des trois études présentées, nous avons identifié des espèces indicatrices des pratiques culturales ou du type d'usage de sol. Comme nous l'avons vu précédemment, l'aspect quantitatif des résultats issus du séquençage haut-débit reste controversé. Il serait donc fort utile de confirmer l'ensemble de ces résultats par l'utilisation d'une autre technique comme la PCR quantitative et donc de dessiner les amorces spécifiques nécessaires aux espèces identifiées comme étant indicatrices. Ces espèces pourraient, par la suite, servir de repère pour les agriculteurs qui cherchent à connaître l'état de leurs sols.

B. Structuration nationale des communautés de CMA

Nous avons observé une distinction des communautés de CMA selon le type d'usage de sol et selon les pratiques culturales appliquées dans les agroécosystèmes ayant un pH compris entre 6 et 7. De façon surprenante, même si nous avons restreint le pH, nous avons observé un impact fort de celui sur la diversité. Or comme une préférence de certaines espèces pour les pH alcalins ou basiques a été montrée et qu'il semble qu'elle soit conservée phylogénétiquement (Bainard *et al.*, 2014), il paraît important de pouvoir affiner la compréhension de la structuration des communautés de CMA aux différents pH. Pour ce faire, des analyses du comportement symbiotique (colonisation, compétition entre CMA) déjà initiées devraient être complétées par répétition de ces expériences à différents pH. De façon plus rapide, la confirmation de l'importance de ce facteur en tant que filtre environnemental selon les types d'agroécosystèmes pourraient se faire en étendant l'analyse des communautés de CMA par l'utilisation d'un plus grand nombre d'échantillons du RMQS et ce en choisissant des sols à pH plus extrêmes. Cette augmentation devrait dans le même temps préciser le rôle du climat sur les communautés de CMA et permettre une meilleure évaluation des influences des pratiques culturales sur celles-ci, surtout dans la partie sud de la France. Dans cette dernière optique, une analyse de l'effet des durées des prairies temporaires ainsi que de l'apport d'azote dans ces prairies sur la diversité des communautés de CMA à l'échelle du champ pourrait être effectuée via l'exploitation d'échantillons des parcelles de l'ORE de Lusignan ayant pour conditions suivantes : trois ans de cultures alternés avec trois ans de prairie avec ajout d'azote, trois ans de culture en rotation avec six années de prairie avec ou sans apport d'azote (*c.f.* Tableau 2.1).

C. Dynamique de la diversité des CMA

Nous avons vu que lorsqu'une prairie est retournée et ré-établie, à court terme, une augmentation de la diversité des CMA en symbiose a été observée au sein de l'espèce *Plantago lanceolata*. Comme il a été montré des différences de communautés de CMA selon la plante hôte et qu'elles évoluent au cours du temps (Bainard *et al.*, 2014), il serait donc intéressant, d'une part, de confirmer ce constat sur d'autres espèces végétales habituellement trouvées dans les prairies temporaires et bandes enherbées et d'autre part, d'en étudier la dynamique au cours du temps. Les résultats obtenus pourront fournir des informations importantes quant à la gestion et à l'entretien de cette diversité notamment dans les prairies temporaires et bandes enherbées. Celles-ci sont obligatoires ou subventionnées par la PAC afin de limiter l'érosion des sols mais aussi de permettre un maintien de la biodiversité qui pourrait servir de réservoir de biodiversité aux cultures.

D. Prairies: réservoir de biodiversité

Pour savoir si les prairies temporaires et si les bandes enherbées adjacentes aux cultures servent réellement de réservoir de biodiversité concernant les CMA, d'autres expérimentations sont indispensables. En effet, les CMA sont connus pour former d'imposants réseaux mycéliens colonisant via un même réseau plusieurs espèces végétales. Comprendre comment et dans quelle mesure les réseaux mycéliens favorisent la colonisation racinaire, la structuration des communautés de CMA des cultures adjacentes ainsi que la santé et la productivité des plantes est donc nécessaire. Dans cette optique, la zone d'études de Fenay, dont une analyse du sol et des communautés bactériennes a déjà été effectuée (Constancias *et al.*, soumis) s'avère être une zone d'échantillonnage d'intérêt. Un échantillonnage indépendant des symbioses actives dans les champs et prairies y a été effectué et mériterait d'être encore exploité dans le futur. De plus, une collaboration permettrait d'obtenir une vue d'ensemble de l'assemblage des communautés bactériennes et fongiques à l'échelle de ce paysage agricole et d'en comprendre le fonctionnement.

V. Nouvelles études envisagées

Alors que les entreprises d'inocula commencent à fleurir dans le monde et que les magazines de jardinage parlent de plus en plus du potentiel des CMA pour les particuliers, il me paraît essentiel que la communauté scientifique puisse répondre d'urgence aux questions suivantes :

- Qu'en est-il de la dispersion des espèces et des populations de CMA ? Existe-t-il des espèces endémiques ? Existe-t-il des espèces invasives ? Certaines espèces sont-elles absentes de certains pays ? Les CMA « rares » sont-ils moins dispersés ? En outre, qu'en est-il vraiment de la biogéographie des espèces et populations de CMA au plan mondial et local ?
- Quels sont tous les filtres environnementaux ? Quelle en est la hiérarchisation ? Celle-ci varie-t-elle selon l'échelle analysée (communauté/ populations) ?

- Quelles sont les traits qui permettent aux espèces de passer ces filtres ? Ces traits sont-ils conservés taxonomiquement et phylogénétiquement ? Quelles en sont les dynamiques ?
- Quels sont les effets des inocula commerciaux sur ces différents points ? En quelles proportions, comment et combien de temps un génotype, une espèce, un genre influence-t-il la communauté ? Quels en sont les bénéfices en termes de diversité et de productivité ?

Pour pouvoir répondre à ces questions, il faut mettre en place de nombreuses études au champ et en laboratoire. En voici quelques exemples :

- Un échantillonnage mondial approfondi des communautés de CMA serait donc souhaitable. De façon générale, il est préconisé d'en effectuer un avant toute inoculation. Celui-ci couplé à des enquêtes météorologiques, pédo-chimiques notamment devraient nous renseigner sur la hiérarchisation des filtres environnementaux et en partie sur la dispersion des CMA.
- Le développement de marqueurs fonctionnels à la symbiose permettrait d'établir un état des symbioses en place aux champs et donc le besoin potentiel d'une inoculation. Cela permettrait aussi, si les marqueurs sont spécifiques, de vérifier le fonctionnement d'une inoculation spécifique et leur devenir aux champs.
- Des études en laboratoire de communautés artificielles pourraient, comme cela a déjà été engagé (Thonar *et al.*, 2014) aussi être faites pour caractériser les interactions (facilitation, compétition ou suppression) au sein des espèces, genres ou des familles pour mieux comprendre l'établissement des communautés et leur régulation. Au niveau populationnel, il serait intéressant de voir quelles sont les différences de traits d'histoire de vie ainsi que les différences fonctionnelles des différentes populations voire des différents génotypes. Dans ce but, des amorces de PCR quantitative pourraient être dessinées et utilisées sur l'espèce modèle *Rhizophagus irregularis* afin de quantifier la colonisation des génotypes différents au sein d'une même plante. Dans le même objectif et en laboratoire, des approches de microscopie pourraient être envisagées avec des marquages des différents génotypes grâce à des amorces avec fluorochrome.
- La quantification des échanges nutritifs en conditions normales et en conditions de stress (minéral, hydrique, lumineux) lors de la symbiose active pourraient permettre de comprendre comment différents génotypes, espèces, interagissent entre eux et avec les plantes. La dynamique de ces interactions sera aussi à considérer.

Références bibliographiques de la conclusion générale et perspectives

- Alguacil MM, Lozano Z, Campoy MJ, Roldan A (2010) Phosphorus fertilisation management modifies the biodiversity of AM fungi in a tropical savanna forage system. *Soil biology and Biochemistry* 42: 1114-1122. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.03.012
- Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E (1995) Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170: 47-62. DOI: 10.1007/BF02183054
- An ZQ, Hendrix JW, Hershman DE, Ferriss RS, Henson GT (1993) The influence of crop-rotation and soil fumigation on a mycorrhizal fungal community associated with soybean. *Mycorrhiza* 3:171-182. DOI: 10.1007/BF00203611
- Aroca R, Porcel R, Ruiz-Lozano JM (2007) How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytologist* 173: 808-816. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01961.x
- Auge RM (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* 11: 3-42.
- Avio L, Castaldini M, Fabiani A, Bedini S, Sbrana C, Turrini A, Giovannetti M (2013) Impact of nitrogen fertilization and soil tillage on arbuscular mycorrhizal fungal communities in a Mediterranean agroecosystem. *Soil biology and Biochemistry* 67: 285-294. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.09.005
- Bainard LD, Bainard JD, Hamel C, Gan Y (2014) Spatial and temporal structuring of arbuscular mycorrhizal communities is differentially influenced by abiotic factors and host crop in a semi-arid prairie agroecosystem. *FEMS Microbiology Ecology* 88: 333-344. DOI: 10.1111/1574-6941.12300
- Biermann B and Linderman RG (1983) Use of vesicular arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist* 95: 97-105. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1983.tb03472.x
- Burrows RL and Pfleger FL (2002) Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Canadian Journal of Botany* 80: 120-130. DOI: 10.1139/B01-138
- Constancias F, Terrat S, Saby NPA, *et al.* (Submitted) Mapping and determinism of soil microbial community distribution across an agricultural landscape.
- Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (2001) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 203-209. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2001.tb00841.x
- Depetris-Chauvin ND, Mulangu F, Porto G (2012). Food production and consumption trends in sub-saharan Africa: prospects for the transformation of the agricultural sector. *Working Paper, United Nations Development Program* 011: 1-74.
- Egerton-Warburton LM, Johnson NC, Allen EB (2007) Mycorrhizal community dynamics following nitrogen fertilization: a cross-site test in five grasslands. *Ecological Monographs* 77: 527-544. DOI: 10.1890/06-1772.1
- Goss MJ and de Varennes A (2002) Soil disturbances reduces the efficacy of mycorrhizal associations for early soybean growth and N₂ fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1167-1173. DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00053-6
- Hao XL, Jiang R, Chen T (2011) Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 27: 611-618. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq725
- Hijri I, Sykorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mader P, Wiemken A, Redecker D (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15: 2277-2289. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02921.x
- Hamady M and Knight R (2009) Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Research* 19: 1141-1152. DOI: 10.1101/gr.085464.108
- Husband R, Herre EA, Turner SL, Gallery R, Young JPW (2002) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Molecular Ecology* 11: 2669-2678. DOI: 10.1046/j.1365-294X.2002.01647.x
- Jakobsen I, Read D, Lewis D, Fitter A, Alexander I (1992) Phosphorus transport by external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Mycorrhizas in Ecosystems Walling-ford*; CAB International 48-54. <http://www.jstor.org/stable/2557412>
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard F (2002) Diversity and structure of AM communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225-234. DOI: 10.1007/s005572-002-0163-z

- Jiao H, Chen Y, Liu X, Liu R (2011) Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in greenhouse soils continuously planted to watermelon in north China. *Mycorrhiza* 21: 681-688. DOI: 10.1007/s00572-011-0377-z
- Kabir Z (2005) Tillage or no-tillage : impact on mycorrhizae. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 23-29. DOI: 10.4141/cjss2013-067
- Klironomos JN, Hart MM, Gurney JE, Moutoglis P (2001) Interspecific differences in the tolerance of arbuscular mycorrhizal fungi to freezing and drying. *Canadian Journal of Botany* 79: 1161-1166. DOI: 10.1139/cjb-79-10-1161
- Koch AM, Antunes PM, Baryo KM, Cipollini D, Mummey DL, Klironomos JN (2011) The effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal and garlic mustard introductions on native AM fungal diversity. *Biological Invasions* 13: 1627-1639. DOI: 10.1007/s10530-010-9920-7
- Kohout P, Sudova R, Janouskova M, Ctvrtlikova M, Hejda M, Pankova H, Slavikova R, Stajerova K, Vosatka M, Sýkorová Z (2014) Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry* 68: 482-493. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.08.027
- Koning NBJ, Van Ittersum MK, Becx GA et al. (2008) Long-term global availability of food: continued abundance or new scarcity. *NJAS Wageningen Journal of Life Sciences* 55: 229-292. DOI: 10.1016/S1573-5214(08)80001-2
- Lekberg Y, Gibbons SM, Rosendahl S (2014) Will different OTU delimitation methods change interpretation of arbuscular mycorrhizal fungal community patterns? *New Phytologist* 202: 1101-1104. DOI: 10.1111/nph.12758
- Li LF, Li T, Zhang Y, Zhao ZW (2010) Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and their distribution patterns related to host-plants and habitats in a hot and arid ecosystem, southwest China. *FEMS Microbiology Ecology* 71: 418-427. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2009.00815.x
- Liu Y, Shi G, Mao L, et al. (2012) Direct and indirect influences of 8 years of nitrogen and phosphorus fertilization on Glomeromycota in an alpine meadow ecosystem. *New Phytologist* 194: 523-535. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04050.x
- Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mader P, Boller T, Wiemken A (2003) Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 2816-2824. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003
- Oehl F, Sieverding E, Mäder P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, Wiemken A (2004) Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138: 574-583. doi: 10.1007/s00442-003-1458-2
- Öpik M, Moora M, Zobel M, Saks U, Wheatley R, Wright F, Daniell T (2008) High diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in boreal herb-rich coniferous forest. *New Phytologist* 179:867-876. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02515.x
- Öpik M, Zobel M, Cantero JJ et al. (2013) Global sampling of plant roots expands the described molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 23:411-430. DOI: 10.1007/s00572-013-0482-2
- Pivato B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougél C, van Tuinen D (2007) Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. *New Phytologist* 176: 197-210. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02151.x
- Powell JR and Sikes BA (2014) Method or madness : does OTU delineation bias our perceptions of fungal ecology ? *New Phytologist* 202: 1095-1097. DOI: 10.1111/nph.12823
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stuermer SL, Morton JB, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23: 515-531. DOI: 10.1007/s00572-013-0486-y
- Rosendahl S and Matzen HB (2008) Genetic structure of arbuscular mycorrhizal populations in fallow and cultivated soils. *New Phytologist* 179: 1154-1161. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02535.x
- Scheublin TR, van Logtestijn RSP, van der Heijden MGA (2007) Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *Journal of Ecology* 95: 631-638. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2007.01244.x
- Sýkorová Z, Wiemken A, Redecker D (2007b) Co-occurring *Gentiana verna* and *Gentiana acaulis* and their neighboring plants in two Swiss upper montane meadows harbor distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5426-5434. DOI: 10.1128/AEM.00987-07
- van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00688.x

Annexe 1

La plus grande sous-unité de l'ARN
polymerase II en tant que nouveau gène
marqueur pour l'étude, au champ, des
assemblages de CMA

The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of arbuscular mycorrhizal fungi in the field

Short title: RPB1 as marker for AMF assemblages

Herbert Stockinger^{1,2}, Marine Peyret-Guzzon², Sally Koegel³, Marie-Lara Bouffaud² and Dirk Redecker^{1*}

In press in PLOS ONE journal

1 Université de Bourgogne, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, 21000, Dijon, France.

2 INRA, UMR1347 Agroécologie, BP 86510, 21000, Dijon, France.

3 Botanical Institute, Hebelstrasse 1, 4056 Basel, Switzerland

* **Corresponding author:** dirk.redecker@dijon.inra.fr

Abstract

Due to the potential of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF, *Glomeromycota*) to improve plant growth and soil quality, the influence of agricultural practice on their diversity continues to be an important research question. Up to now studies of community diversity in AMF have exclusively been based on nuclear ribosomal gene regions, which in AMF show high intra-organism polymorphism, seriously complicating interpretation of these data. We designed specific PCR primers for 454 sequencing of a region of the largest subunit of RNA polymerase II gene, and established a new reference dataset comprising all major AMF lineages. This gene is known to be monomorphic within fungal isolates but shows an excellent barcode gap between species. We designed a primer set to amplify all known lineages of AMF and demonstrated its applicability in combination with high-throughput sequencing in a long-term tillage experiment. The PCR primers showed a specificity of 99.94 % for glomeromycotan sequences. We found evidence of significant shifts of the AMF communities caused by soil management and showed that tillage effects on different AMF taxa are clearly more complex than previously thought. The high resolving power of high-throughput sequencing highlights the need for quantitative measurements to efficiently detect these effects.

Key words: arbuscular mycorrhiza, community analysis, RPB1, tillage, 454, marker gene, maize root

I. Introduction

Arbuscular mycorrhiza is an extremely widespread mutualistic symbiosis between plants and obligatory symbiotic fungi from the phylum *Glomeromycota*. About 240 species of glomeromycotan fungi have been described so far, based on their spore morphology and molecular phylogenetic data (Schüßler and Walker, 2010 ; Redecker *et al.*, 2013). Most crop plants are hosts to this association and crop production may potentially benefit from it (Smith and Read, 2008). Therefore the relationship between different types of agricultural production on one hand and assemblages and populations of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on the other hand has been in the focus of research activity.

Traditionally, AMF have been identified based on their spore morphology. As only few morphological characters are present, this is not a trivial task, in particular when using field-collected spores which may lack crucial features due to degradation caused by other soil biota. Spores of very similar morphologies are now known to be produced by phylogenetically distant AMF (Walker *et al.*, 2007). Several biases are implicit to this approach, namely the overestimation of the importance of prolific sporulators, and on the other side the non-detectability of others that scarcely form spores. Moreover, spores represent the inoculum potential of the soil, not necessarily the symbiotically active population. To avoid these potential problems, molecular methods have been developed which allow the detection of AMF in soil as well as within colonized roots, allowing groundbreaking insights into AMF ecology, e.g. the study by Helgason *et al.* (1998). Since then, numerous field studies on AM fungal ecology have been conducted using molecular markers (e.g. Hempel *et al.*, 2007; Öpik *et al.*, 2009 ; Lumini *et al.*, 2010). However, the only genes used in studies on species-level diversity were different regions of nuclear-encoded ribosomal RNA, which in the *Glomeromycota* show numerous slightly different variants within the fungal organism. This fact complicates the separation of closely related species and annotation in large-scale diversity surveys, such as deep sequencing approaches, which offer superior depth of analysis than cloning-sequencing approaches. In fact, previous studies have shown that considerable parts of fungal diversity may remain unfathomed due to technical constraints inherent to cloning and sequencing techniques (Öpik *et al.*, 2009).

In phylogenetic studies, the need to study several loci in order to improve reliability and resolution power of phylogenies is widely recognized (James *et al.*, 2009; Schoch *et al.*, 2009), therefore several alternative marker genes have been proposed in this context also for the *Glomeromycota*. The largest subunit of RNA polymerase II (RPB1) gene stood out for several reasons: it has several variable regions useful for species discrimination; according to present knowledge it is a single-copy gene in fungi, avoiding problems with paralogues. In fact, the genome sequence of *Rhizophagus irregularis* (Tisserant *et al.*, 2013) shows no intra-isolate variants of this gene. These properties render this marker very attractive for large-scale diversity surveys of the *Glomeromycota*. In the present study, we therefore assembled a reference database of RPB1 sequences and designed primers for the *Glomeromycota* to address the possible use of this marker gene for field studies of AMF.

We tested the usefulness of the primers for high-throughput sequencing for the analysis of species assemblages of AMF in maize roots in different tillage treatments in a long-term experimental site in Tänikon, Switzerland. This site has been previously analyzed using different spore-based and molecular approaches at the species and intraspecies level (Jansa *et al.*, 2002; Jansa *et al.*, 2003; Börstler *et al.*, 2010), providing us the

advantage of relating our results to a large body of findings. Tillage has been suggested to be "the most unique and strongest agricultural selection pressure for mycorrhizal symbionts" (Verbruggen and Kiers, 2010). Others studies in different locations have used DNA fingerprinting methods or cloning/sequencing approaches (Helgason *et al.*, 1998; Alguacil *et al.*, 2008; Borriello *et al.*, 2012), thus to our knowledge this is the first study addressing tillage effects on AMF communities in roots in arable soils by using 454 sequencing.

II. Material and Methods

A. Fungal reference cultures

Spores of most AMF species of the reference dataset were obtained from the 'International Bank for the *Glomeromycota*' (BEG/IBG) at Dijon (France) or from the 'International culture collection of (vesicular) arbuscular mycorrhizal fungi' (INVAM, Morgantown, USA). For details see Table A.1. The recently proposed nomenclature of the *Glomeromycota* of Redecker *et al.* (2013) is used. The authors would like to thank Joe Morton (INVAM) and Valérie Monfort-Pimet (BEG) for providing fungal cultures.

B. DNA Extraction

DNA of single or multiple spores was extracted according to Naumann *et al.* (2010) with 5-10 µl of 5x GoTaq Flexi Reaction Buffer (Promega, Fitchburg, USA) or 10 x MP Taq Pol buffer without MgCl₂ (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) (see Supplementary Table A.1). In some cases, the DNeasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to extract DNA of a larger quantity of spores (see Table A.1).

Table A.1: Biological materials used for the reference dataset.

Accession	Name	isolate/origin
HG315978	<i>Acaulospora laevis</i>	BEG242/LPA47, IBG collection, Dijon
HG315982	<i>Acaulospora laevis</i>	BEG242/LPA47, IBG collection, Dijon
HG315975	<i>Acaulospora longula</i>	BEG8/LPA46, IBG collection, Dijon
HG316014	<i>Ambispora leptoticha</i>	CR312, INVAM, West Virginia University, Morgantown, USA
HG316019	<i>Ambispora leptoticha</i>	CR312, INVAM, West Virginia University, Morgantown, USA
HG315988	<i>Archaeospora trappei</i>	CR401B, INVAM, West Virginia University, Morgantown, USA
HG316013	<i>Cetraspora nodosa</i>	BEG4/LPA50, IBG collection, Dijon
HG316018	<i>Claroideoglossum claroideum</i>	BEG23/LPA31, IBG collection, Dijon
HG315991	<i>Claroideoglossum etunicatum</i>	BEG247/LPA61, IBG collection, Dijon
HG316016	<i>Dentiscutata erythropus</i>	HA150B, isolate from INVAM, cultivated at IBG Dijon
HG316017	<i>Dentiscutata erythropus</i>	HA150B, isolate from INVAM, cultivated at IBG Dijon
HG316012	<i>Dentiscutata heterogama</i>	BEG35/LPA39, IBG collection, Dijon
HG315981	<i>Diversispora epigaea</i>	BEG47/LPA10, IBG collection, Dijon
HG315973	<i>Funnelformis mosseae</i>	BEG246/LPA58, IBG collection, Dijon
HG315993	<i>Funnelformis sp.2</i>	trap culture (AGc)
HG315994	<i>Funnelformis sp.2</i>	trap culture (AGc)
HG315995	<i>Funnelformis sp.2</i>	trap culture (AGc)
HG315998	<i>Gigaspora candida</i>	BEG17/LPA52/HE-MOS, IBG collection, Dijon
HG316011	<i>Gigaspora margarita</i>	BEG34/LPA2, IBG collection, Dijon
HG315979	<i>Gigaspora rosea</i>	BEG9/LPA23, IBG collection, Dijon
HG315980	<i>Gigaspora rosea</i>	BEG9/LPA23, IBG collection, Dijon
HG315989	<i>Glomus cf. diaphanum</i>	BR608b-3, INVAM, West Virginia University, Morgantown, USA
HG316006	<i>Glomus macrocarpum</i>	Att1495-16, Chris Walker collection
HG316007	<i>Glomus macrocarpum</i>	Att1495-16, Chris Walker collection
HG316021	<i>Glomus macrocarpum</i>	Att1519-0, Chris Walker collection
HG315968	<i>Glomus sp. MES-190</i>	field collection, MES-190, leg. Matthew E.Smith, Argentina
HG315969	<i>Glomus sp. MES-190</i>	field collection MES-190, leg. Matthew E.Smith, Argentina
HG315974	<i>Paraglossum brasiliense</i>	BEG 239/LPA25, IBG collection, Dijon
HG315976	<i>Paraglossum brasiliense</i>	BEG239/LPA25, IBG collection, Dijon
HG315977	<i>Paraglossum brasiliense</i>	BEG239/LPA25, IBG collection, Dijon
HG316010	<i>Paraglossum occultum</i>	CL700A, NVAM, West Virginia University, Morgantown, USA
HG315985	<i>Paraglossum sp.</i>	field sample, long-term experimental field site, INRA Lusignan, France
HG315986	<i>Paraglossum sp.</i>	field sample, long-term experimental field site, INRA Lusignan, France
HG315997	<i>Racocetra castanea</i>	BEG1/LPA4, IBG collection, Dijon
HG316003	<i>Racocetra cf. weresubiae</i>	trap culture
HG315970	<i>Redeckera fulva</i>	field collection CL/MART06.056, Martinique, leg. C. Lecuru, det. D. Redecker, herbarium Université de Lille
HG315971	<i>Redeckera fulva</i>	field collection CL/MART06.003, Martinique, leg. C. Lecuru, det. D. Redecker, herbarium Université de Lille
HG315972	<i>Redeckera fulva</i>	field collection CL/MART06.057, Martinique, leg. C. Lecuru, det. D. Redecker, herbarium Université de Lille
HG316001	<i>Rhizophagus clarus</i>	BEG248/LPA64, IBG collection, Dijon
HG316004	<i>Rhizophagus clarus</i>	WV235, INVAM, West Virginia University, Morgantown, USA
HG316024	<i>Rhizophagus clarus</i>	BEG142/LPA16, IBG collection, Dijon
HG316020	<i>Rhizophagus intraradices</i>	MUCL49413, root organ culture, GINCO, Belgium
HG315983	<i>Rhizophagus irregularis</i>	LPA71/DAOM197198, IBG collection, Dijon
HG315984	<i>Rhizophagus irregularis</i>	LPA71/DAOM197198, IBG collection, Dijon
HG315987	<i>Rhizophagus irregularis</i>	BEG141/LPA8, IBG collection, Dijon
HG315992	<i>Rhizophagus irregularis</i>	MB002, isolate from Austria, Stockinger collection
HG315996	<i>Rhizophagus irregularis</i>	BEG145, Stockinger collection
HG315999	<i>Rhizophagus irregularis</i>	JJ141, root organ culture established by Jan Jansa from field site in Switzerland
HG316000	<i>Rhizophagus irregularis</i>	JJ746, root organ culture established by Jan Jansa from field site in Switzerland
HG316002	<i>Rhizophagus irregularis</i>	BEG244/LPA54, IBG collection, Dijon
HG316008	<i>Rhizophagus irregularis</i>	BEG144, IBG collection, Dijon
HG316009	<i>Rhizophagus irregularis</i>	BEG235/LPA7, IBG collection, Dijon
HG316015	<i>Rhizophagus irregularis</i>	JJ746, root organ culture established by Jan Jansa from field site in Switzerland
HG316022	<i>Sclerocystis cf. pubescens HS-2013</i>	environmental sample, Edinburgh, leg. et det. C. Walker
HG316023	<i>Sclerocystis cf. pubescens HS-2013</i>	environmental sample, Edinburgh, leg. et det. C. Walker
HG315990	<i>Sclerocystis sinuosa</i>	MD126, INVAM, West Virginia University, Morgantown, USA
HG316005	<i>Septoglossum viscosum</i>	U1, University of Alessandria, Italy

IBG: International Bank for the Glomeromycota

INVAM: International Collection of Vesicular-arbuscular and Arbuscular Mycorrhizal Fungi

C. PCR reference dataset and Sanger sequencing

Nested PCRs were performed with Phusion High Fidelity DNA polymerase (Finnzymes, Vantaa, Finland). Several new primers were designed and used in combination with published primers (Supplementary Table A.1, Figure A.1). The 1st PCR was performed with 0.02 U/ μ l Phusion polymerase, 1 μ l genomic DNA, 1 x Phusion HF Buffer, 0.5 μ M of each primer, 0.2 mM of each dNTPs in a total volume of 20 μ l. The same setup was used for the 2nd round of the nested PCR, for which 0.5 μ l of the first PCR was used as template. Cycling conditions were adjusted according to the primer combination used. Primers with corresponding PCR cycling conditions are listed in Table S1. PCR products were cloned using the StrataClone Blunt PCR Cloning Kit (Agilent, Santa Clara, USA) according to manufacturer's protocol. Several clones were amplified by PCR with vector primer and clones with the correct insert were selected for further analyses. Clones were grown overnight in liquid Terrific Broth medium and plasmids were purified using a NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Sanger sequencing was performed by GATC (Konstanz, Germany) or Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Sequences were checked and assembled using the Staden package (Bonfield *et al.*, 1995). All sequences were aligned in ARB (Stamatakis, 2006). Intron-exon structure was determined in silico by comparison with published RPB1 gene structures and with the amino acid sequences. The sequences were submitted to the EMBL database under the accession numbers HG315968-HG316024 (see Table A.1).

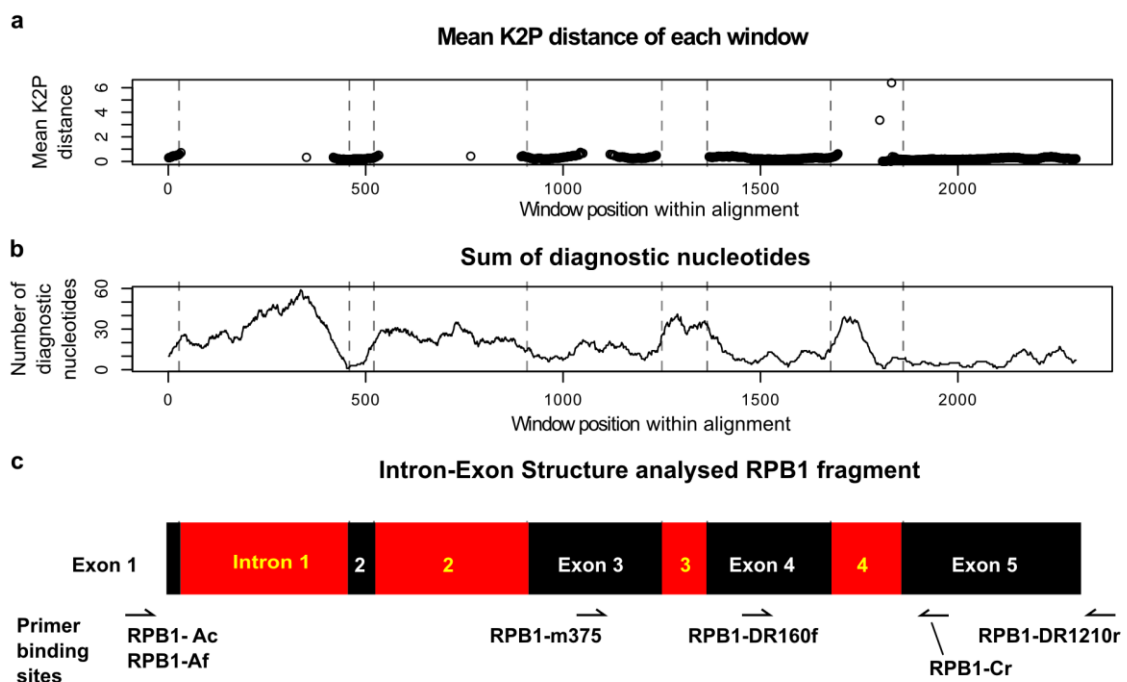


Figure A.1: Analysis of structure and variability of partial RPB1 genes in the longer reference dataset 1. A 50-bp sliding window was used to generate (a) and (b). (a): Mean K2P distances of pairwise comparisons of the sequences: the mean K2P distances within the introns are higher than 6 %, therefore they are outside the range of the x-axis. Consequently, the black lines indicate that the exons have a relatively low mean K2P distance. (b): the sum of diagnostic nucleotides along the alignment as analysed using Spider. A higher number of diagnostic nucleotides indicate good separation of species. (c): corresponding intron-exon structure of partial RPB1, including primer binding sites within the alignment.

Supplementary Table A.1: Primers and PCR conditions used for the reference datasets.

Accession	Clone	Name	DNA extraction source	Extraction method
HG316008	Hsp125-32	<i>Rhizophagus irregularis</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316006	Hsp134-1	<i>Glomus macrocarpum</i>	multiple spores + hyphae	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316007	Hsp134-22	<i>Glomus macrocarpum</i>	multiple spores + hyphae	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315989	Hsp81-6	<i>Glomus cf. diaphanum</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315992	Hsp103-12	<i>Rhizophagus irregularis</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315985	Mar54	<i>Paraglomus sp.</i>	roots	Qiagen - DNA Plant Mini Kit
HG315986	Mar34	<i>Paraglomus sp.</i>	roots	Qiagen - DNA Plant Mini Kit
HG315976	HSp53-11	<i>Paraglomus brasilianum</i>	3x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315977	HSp53-1	<i>Paraglomus brasilianum</i>	3x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315981	Hsp57-2	<i>Diversispora epigaea</i>	3x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315990	Hsp88-5	<i>Sclerocystis sinuosa</i>	sporocarp	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315983	Hsp74-12	<i>Rhizophagus irregularis</i>	2x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315984	Hsp74-18	<i>Rhizophagus irregularis</i>	2x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315999	Hsp92-9	<i>Rhizophagus irregularis</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315988	Hsp79-1	<i>Archaeospora trappei</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315987	Hsp78B-9	<i>Rhizophagus irregularis</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316014	Hsp111b-22	<i>Ambispora leptoticha</i>	4x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316019	Hsp111b-24	<i>Ambispora leptoticha</i>	4x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315978	HSp73-3	<i>Acaulospora laevis</i>	3x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315982	Hsp73-14	<i>Acaulospora laevis</i>	3x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316022	Hsp145-1	<i>Sclerocystis cf. pubescens HS-2013</i>	sporocarp	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316023	Hsp145-40	<i>Sclerocystis cf. pubescens HS-2013</i>	sporocarp	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315968	HSp20-3	<i>Glomus sp. MES-190</i>	sporocarp	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315969	HSp20-5	<i>Glomus sp. MES-190</i>	sporocarp	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315993	Hsp94B-6	<i>Funneliformis sp.2</i>	sporocarp	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315994	Hsp95-9	<i>Funneliformis sp.2</i>	sporocarp	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315995	Hsp96-15	<i>Funneliformis sp.2</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316004	Hsp128-1	<i>Rhizophagus clarus</i>	9x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316021	Hsp136-2	<i>Glomus macrocarpum</i>	multiple spores + hyphae	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315996	Hsp102-2	<i>Rhizophagus irregularis</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315974	Hsp10-3	<i>Paraglomus brasilianum</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315970	PCR product direct sequencing	<i>Redeckera fulva</i>	piece of sporocarp	
HG315971	PCR product direct sequencing	<i>Redeckera fulva</i>	piece of sporocarp	
HG315972	PCR product direct sequencing	<i>Redeckera fulva</i>	piece of sporocarp	
HG315975	Hsp52-8	<i>Acaulospora longula</i>	multiple spores	Qiagen - DNA Plant Mini Kit
HG316013	Hsp106-10	<i>Cetraspora nodosa</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316018	Hsp100B-4	<i>Claroideoglomus claroideum</i>	10x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315991	Hsp89-3	<i>Claroideoglomus etunicatum</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316016	Hsp109-14	<i>Dentiscutata erythropus</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316017	Hsp109-5	<i>Dentiscutata erythropus</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316012	Hsp105-7	<i>Dentiscutata heterogama</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315973	HSp39-3	<i>Funneliformis mosseae</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315998	Hsp108b-7	<i>Gigaspora candida</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316011	Hsp107b-1	<i>Gigaspora margarita</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315979	Hsp51b-9	<i>Gigaspora rosea</i>	multiple spores	Qiagen - DNA Plant Mini Kit
HG315980	HSp51b-20	<i>Gigaspora rosea</i>	multiple spores	Qiagen - DNA Plant Mini Kit
HG316010	Hsp115-9	<i>Paraglomus occultum</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG315997	Hsp104-4	<i>Racocetra castanea</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316003	Hsp126-25	<i>Racocetra cf. weresubiae</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316024	HSp122-6	<i>Rhizophagus clarus</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316001	Hsp118b-1	<i>Rhizophagus clarus</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316020	Hsp120b-9	<i>Rhizophagus intraradices</i>	single spore	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316002	Hsp124-1	<i>Rhizophagus irregularis</i>	20x spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316015	Hsp97-9	<i>Rhizophagus irregularis</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316000	Hsp97-14	<i>Rhizophagus irregularis</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316009	Hsp117b-29	<i>Rhizophagus irregularis</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x
HG316005	HSp132-3	<i>Septoglomus viscosum</i>	multiple spores	Gotaq Flexi Buffer 5x

Accession	Primer 1 st PCR forward/reverse	PCR conditions 1 st PCR
HG316008	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316006	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1,25'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1,25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1,25'), 72°C- 10', 16°C -
HG316007	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1,25'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1,25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1,25'), 72°C- 10', 16°C -
HG315989	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 30x (98°C-20", 60°C -20", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315992	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG315985	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315986	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315976	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315977	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315981	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30", 36x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315990	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 40x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG315983	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30", 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315984	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30", 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315999	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	99°C-30", 40x (99°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315988	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315987	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG316014	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG316019	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG315978	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 25x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315982	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 25x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG316022	RPB1-Ac/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-10", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-10", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-10", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316023	RPB1-Ac/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-10", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-10", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-10", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315968	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)/RPB1_HS2900r_a	98°C-30", 30x (98°C-10", 60°C -20", 72°C - 45"), 72°C- 10', 16°C -
HG315969	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)/RPB1_HS2900r_a	98°C-30", 30x (98°C-10", 60°C -20", 72°C - 45"), 72°C- 10', 16°C -
HG315993	RPB1-HSm375mix/RPB1-DR1210r	98°C-30", 40x (98°C-10", 60°C -30", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG315994	RPB1-HSm375mix/RPB1-DR1210r	98°C-30", 40x (98°C-10", 60°C -30", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG315995	RPB1-HSm375mix/RPB1-DR1210r	98°C-30", 40x (98°C-10", 60°C -30", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG316004	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316021	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG315996	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG315974	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)/RPB1_HS2680GPr	98°C-30" 40x (98°C-10", 57°C - 20", 72°C - 45"), 72°C- 10', 16°C
HG315970	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)/RPB1-DR2160r	
HG315971	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)/RPB1-DR2160r	
HG315972	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)/RPB1-DR2160r	
HG315975	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG316013	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG316018	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315991	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 40x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316016	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG316017	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG316012	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG315973	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	60°C -30", 72°C - 1.5'), 35x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315998	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -

HG316011	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG315979	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG315980	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.5'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C -
HG316010	RPB1-Ac/RPB1-DR2160r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG315997	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1.25'), 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.25'), 30x (98°C-20", 56°C -30", 72°C - 1.25'), 72°C- 10', 16°C -
HG316003	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316024	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316001	RPB1-Ac/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 59°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316020	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316002	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316015	RPB1-Ac/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316000	RPB1-Ac/RPB1-DR2110r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316009	RPB1-Ac/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 59°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -
HG316005	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-10", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-10", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-10", 63°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C -

Accession	Primer 2 nd PCR forward/reverse	PCR conditions 2 nd PCR
HG316008	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316006	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 35x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316007	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 35x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315989	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 30x (98°C-20", 60°C -20", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315992	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 35"), 72°C- 10', 16°C
HG315985	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315986	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315976	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315977	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315981	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315990	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 61°C -20", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315983	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315984	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	98°C-30", 36x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315999	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r	99°C-30", 30x (99°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315988	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r + RPB1-DR1210r_Aca_div	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315987	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r + RPB1-DR1210r_Aca_div	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316014	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r + RPB1-DR1210r_Aca_div	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316019	RPB1-Ac/RPB1-DR1210r + RPB1-DR1210r_Aca_div	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315978	RPB1-Ac/RPB1-DR2130r	98°C-30", 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG315982	RPB1-Ac/RPB1-DR2130r	98°C-30", 30x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 1.5'), 72°C- 10', 16°C
HG316022	RPB1-DR1210r/RPB1-HS_A1h	98°C-30" 3x (98°C-20", 68°C -30", 72°C - 1), 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316023	RPB1-DR1210r/RPB1-HS_A1h	98°C-30" 3x (98°C-20", 68°C -30", 72°C - 1), 3x (98°C-20", 65°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 62°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG315968	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)	98°C-30", 40x (98°C-10", 55°C -20", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG315969	RPB1-DR160fmix (a,b,c,d)	98°C-30", 40x (98°C-10", 55°C -20", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG315993	RPB1-DR160fmix 10(a,b,c,d,f,g,h,i,k,m)/RPB1-DR1210r	98°C-30", 30x (98°C-10", 64°C -30", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG315994	RPB1-DR160fmix 10(a,b,c,d,f,g,h,i,k,m)/RPB1-DR1210r	98°C-30", 30x (98°C-10", 64°C -30", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG315995	RPB1-DR160fmix 10(a,b,c,d,f,g,h,i,k,m)/RPB1-DR1210r	98°C-30", 30x (98°C-10", 64°C -30", 72°C - 30"), 72°C- 10', 16°C
HG316004	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1210r	98°C-30" 3x (98°C-20", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-20", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-20", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C
HG316021	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-10", 63°C -30", 72°C - 1'), 3x (98°C-10", 61°C -30", 72°C - 1'), 36x (98°C-10", 58°C -30", 72°C - 1'), 72°C- 10', 16°C

HG315996	RPB1-HS_A1a/RPB1-DR1730r	98°C-30" 3x (98°C-20", 60°C -30", 72°C - 45"), 3x (98°C-20", 57°C -30", 72°C - 45"), 36x (98°C-20", 55°C -30", 72°C - 45"), 72°C- 10', 16°C
HG315974	RPB1-HS189GPf/RPB1-DR1210r	98°C-30" 36x (98°C-10", 59°C - 20", 72°C - 20"), 72°C- 10', 16°C
HG315970	RPB1-520f/RPB1-DR1210r	
HG315971	RPB1-520f/RPB1-DR1210r	
HG315972	RPB1-520f/RPB1-DR1210r	

D. RPB1 reference dataset 1

This first dataset comprises a fragment of about 1.5-2.1 kb length and was initially used for primer design, phylogenetic analysis and for identifying variable regions. Around 1233 sites of the aligned exon sequences, were used for constructing phylogenetic trees with RAxML (Stamatakis, 2006, Figure A.2), MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) and MRBAYES (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). The fragment was additionally analysed for variable regions with the package SPIDER (Brown *et al.*, 2012) of R version 2.15.1 (CRAN, 2012).

E. RPB1 reference dataset 2

This dataset contains the abovementioned long sequences and additional shorter sequences spanning the primers RPB1-DR160f to RPB1-DR1210r (Supplementary Table A.1). This increased the number of comparable sequences for 454 sequence analysis. Barcode gap and variability analyses were performed on this fragment using SPIDER.

The aligned sequences were used as references for 454 data analysis, first as reference alignment and after performing 100 inferences of ML search with RAxML (Stamatakis, 2006) as reference tree for EPA RAxML analysis (Berger *et al.*, 2011).

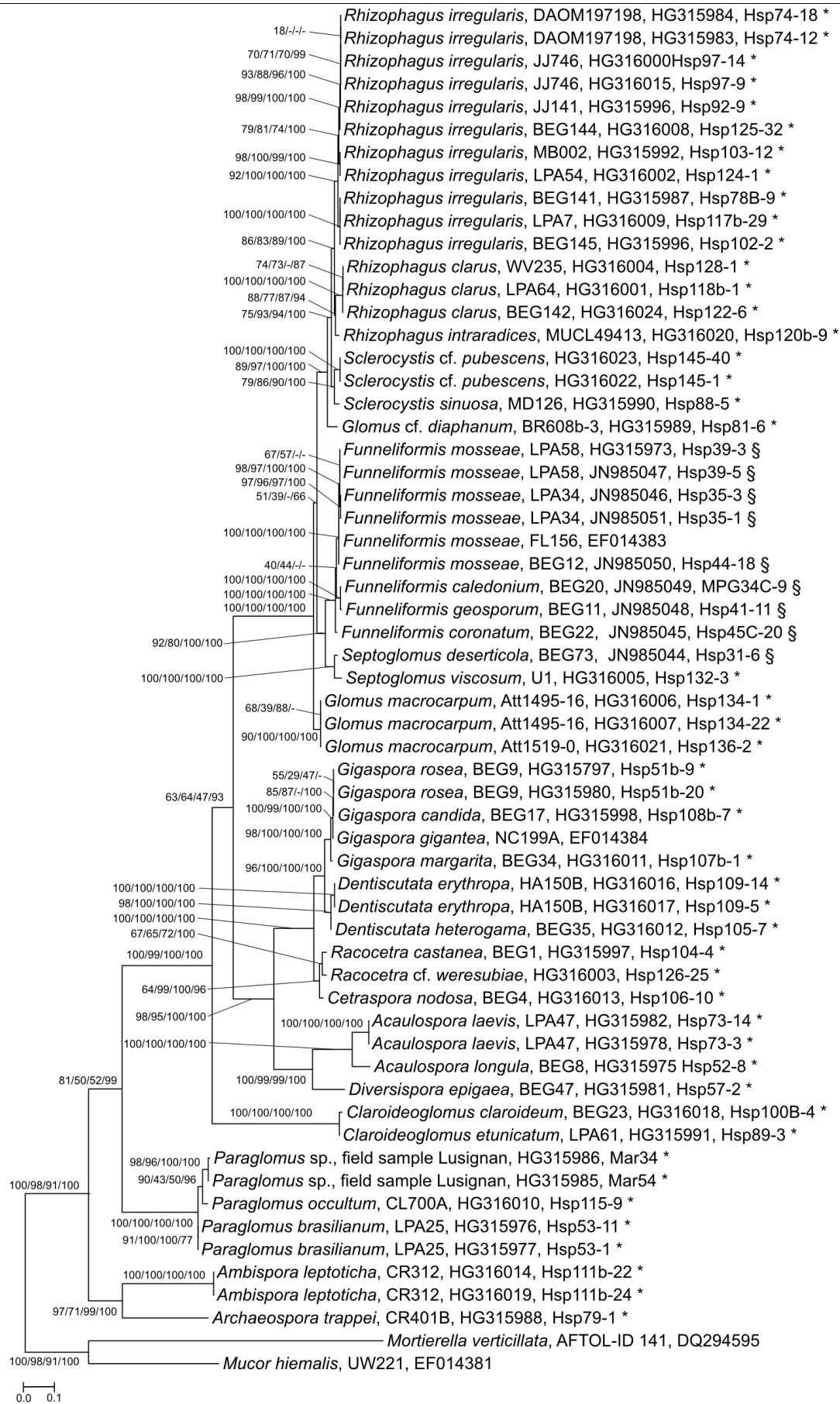
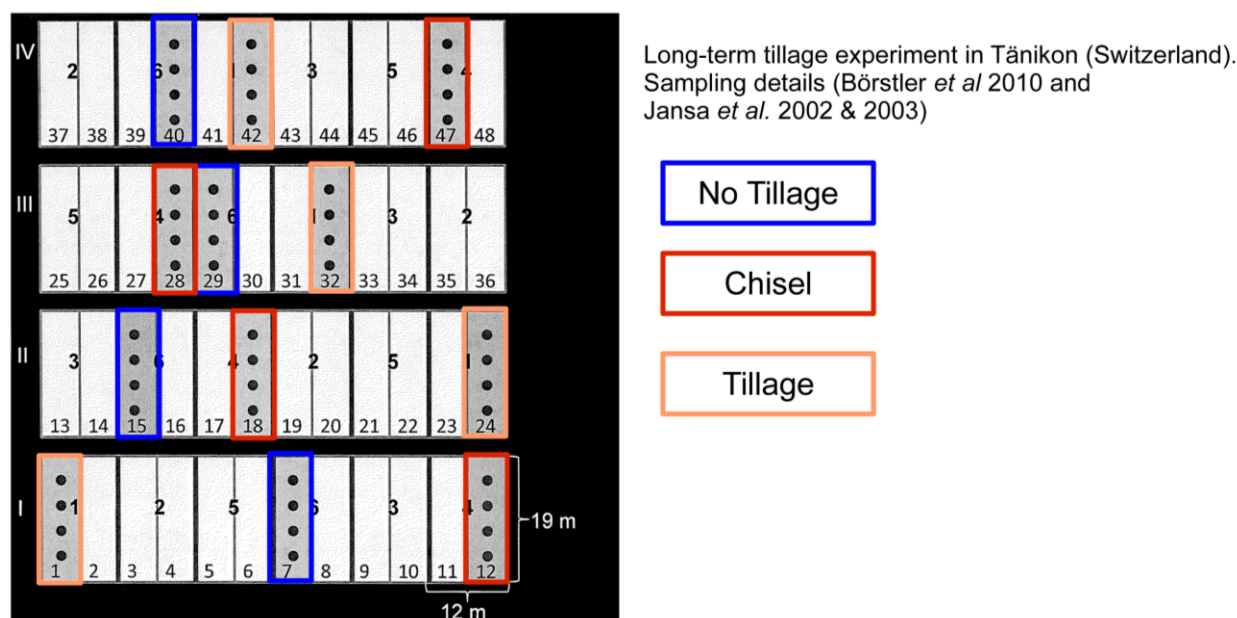


Figure A.2: RAxML phylogenetic tree based on the exon of the fragment RPB1-Ac and RPB1-DR1210. Support values are from RAxML (1000 bootstrap replicates (BR)), MP (1000 BR), NJ (1000 BR) and MrBayes. * Sequences from this study, § Sequences included into Schoch et al. (2012).

F. Field site and sampling

The sampling field site was part of a long-term tillage experiment in Tänikon (Switzerland, (47.4862 N, 8.9195 E)). The site was established in 1987. Details of the experimental setup and soil properties are described by Anken *et al.* (1997) and Jansa *et al.* (2002; 2003). In short, the experiment had six different treatments and was organized in a randomized block design. Each treatment was replicated four times. The site is subjected to crop rotation and *Zea mays* was the crop growing at sampling time in June 2007. Samples were taken from three different treatments: no-tillage (maize was planted directly into the soil), chisel (soil was loosened with a share chisel to a depth of 25 cm without turning the soil) and tillage (soil was ploughed to a depth of 25 cm and turned around). Four plants per plot from each of the four replicate plots of each treatment were collected, a total of 48 plants (Supplementary Figure A.1). Several aliquots of 50-80 mg (fresh weight) root fragments per sample were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Details of the sampling procedure were described by Börstler *et al.* (2010). We thank Jan Jansa (ETH Zürich) and Thomas Anken (Agroscope Reckenholz-Tänikon) for providing access to the field site and Boris Börstler, Zuzana Sýkorová and Odile Thiéry for sampling.



Supplementary Figure A.1: Overview of long-term tillage experimental field site in Tänikon (Switzerland).

G. DNA extraction, PCR and pyrosequencing

DNA of roots was extracted using a DNeasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). The roots were ground in liquid nitrogen and DNA was extracted according to the manufacturer's protocol. The DNA was eluted twice with 70 µl and 50 µl buffer AE. For two samples, the same DNA extract used by Börstler *et al.* (2010) from this sampling was reused instead, because no root aliquots were left (one sample 4 (47-4) from the chisel treatment and one from the no tillage treatment 2 (15-1)).

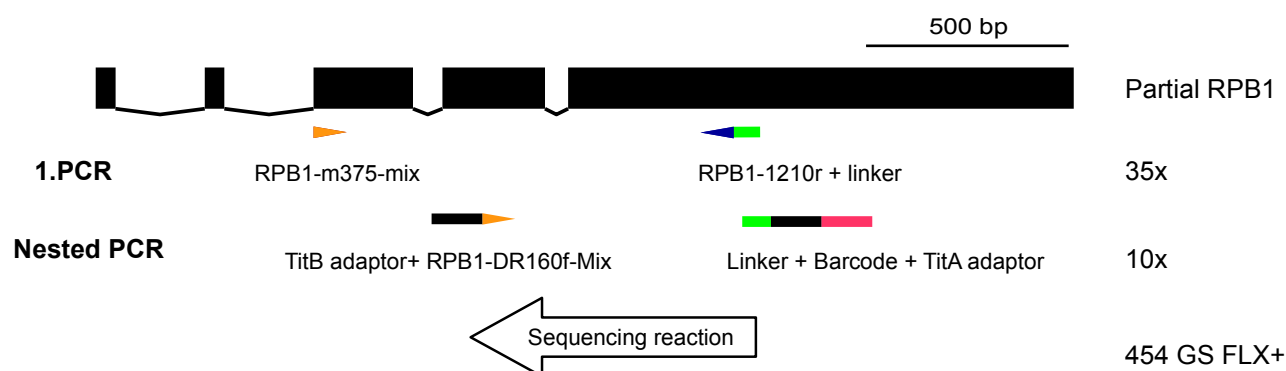
The 1st PCR of the nested reaction was performed using 0.02 U/µl Phusion polymerase, 1 µl genomic DNA, 1 x Phusion HF Buffer, 0.5 µM of each primer (RPB1-HSm375-mix7 and RPB1-1210+linker, Supplementary Table A.2), 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µg/µl BSA, 3 % DMSO in a total volume of 20 µl. The cycling parameters were: 30 s at

98 °C, 35 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C (Eppendorf Mastercycler epgradient S, Vaudaux-Eppendorf, Schönenbuch, Switzerland). Each DNA extract was amplified in three replicates and amplification success was checked on an agarose gel. The three replicates were pooled and purified using the Zymo Research DNA Clean & Concentrator - 5 Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, USA). The PCR product was eluted in 20 µl of sterile water.

In the nested PCR-approach, the adapters for 454 sequencing and barcodes were added in the second round as previously suggested (Berry *et al.*, 2011). In addition, this approach made it possible to sequence directionally from the primers containing the TitA adaptor. Barcodes of 9 bp with 4 base differences between each other were selected with the software BARCRAWL (Frank, 2009) and are listed in Supplementary Table A.2 (see also Supplementary Figure A.2). The nested PCR was performed with 0.02 U/µl Phusion polymerase, 1 µl purified PCR product, 1 x Phusion HF Buffer, 0.5 µM of each primer (TitB-adaptor+ RPB1-DR160f-mix10 and linker+Barcode+TitA-adaptor, Supplementary Table A.2), 0.2 mM of each dNTPs, 0.4 µg/µl BSA, 3 % DMSO in a total volume of 20 µl. Cycling parameters were 30 s at 98 °C, 10 cycles of 10 s at 98 °C, 30 s at 64 °C, 30 s at 72 °C, followed by 10 min at 72 °C (Eppendorf Mastercycler epgradient S). Each purified PCR product from the first round was again amplified three times and products were pooled. PCR products were verified on an agarose gel.

The PCR product of the nested approach was run on a 1.5 % agarose gel (1 % SeaKem-0.5 % NuSieve; Cambrex Bio Science, Rockland, USA) and bands within the range of 650 bp-1 kb were cut out, mainly to remove fragment from the 1st PCR. The DNA fragments were recovered from the gel in 20 µl of water according to the Zymoclean Gel DNA Recovery Kit protocol (Zymo Research Corporation, Irvine, USA). Recovered DNA fragments were verified visually on a 1 % agarose gel.

Each of the four sub-samples of a plot were pooled and the concentration, size and quality of the pooled samples was analysed with the Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, USA). All samples were mixed equimolarly for the final 454 PCR amplicon sample, which was sent to GATC (Konstanz, Germany) for sequencing 6 x 1/16 regions of a 454 GS FLX+ plate. The whole data set was submitted to Sequence Read Archive (ERP002624).



Supplementary Figure A.2: Amplification overview of the 454 experiment.

Supplementary Table A.2: Details for all Primers used in the 454 studies.

RPB1-HS375mix-7	Sequences
RPB1-m375_A	GCCTTCGCGCTGTTTGG
RPB1-m375_B_wobbel	GTCTTCGYGCGGTATGG
RPB1-m375_C	CGTAGACTCAAGGCTGTATGG
RPB1-m375_D	CCGTCTCAAAGCTGTATGG
RPB1-m375_E	TCGTCTCCGTGCAGTATGG
RPB1-m375_F	TCGACTCATAGCTGTGTGG
RPB1-m375_G	CGTCTTCGTGCAGTTTGG

Linker+RPB1-DR1210r	
Linker	RPB1-DR1210r
CATTAAAGCAGATCTCGATCCC	ATGACCCATCATTGACATTTTGTG

TitB+RPB1-DR160f-mix10			
Primer name	TitB Adaptor 454	Linker	Primer sequences
RPB1_DR160FM	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AT	CGTCCAAGTATACAAGTTGATGG
RPB1-DR160FA	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCSAGTATTCAAATGGAYGG
RPB1-DR160FB	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCAAGCATCCAAATGGACGG
RPB1-DR160FC	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCAAGTATACAATGGATGG
RPB1-DR160FD	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCGAGTATTCAGATGGACGG
RPB1-DR160FF	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCAAGCATTCAAATGGACGG
RPB1-DR160FG	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCGAGTATCCAAATGGATGG
RPB1-DR160FH-LO	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AT	CGTCCTAGTATACTTATGGATGG
RPB1-DR160FI	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCTAGCATCCAAATGGATGG
RPB1-DR160FK	CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAG	AA	CCCAGTATATTAATGGACGG

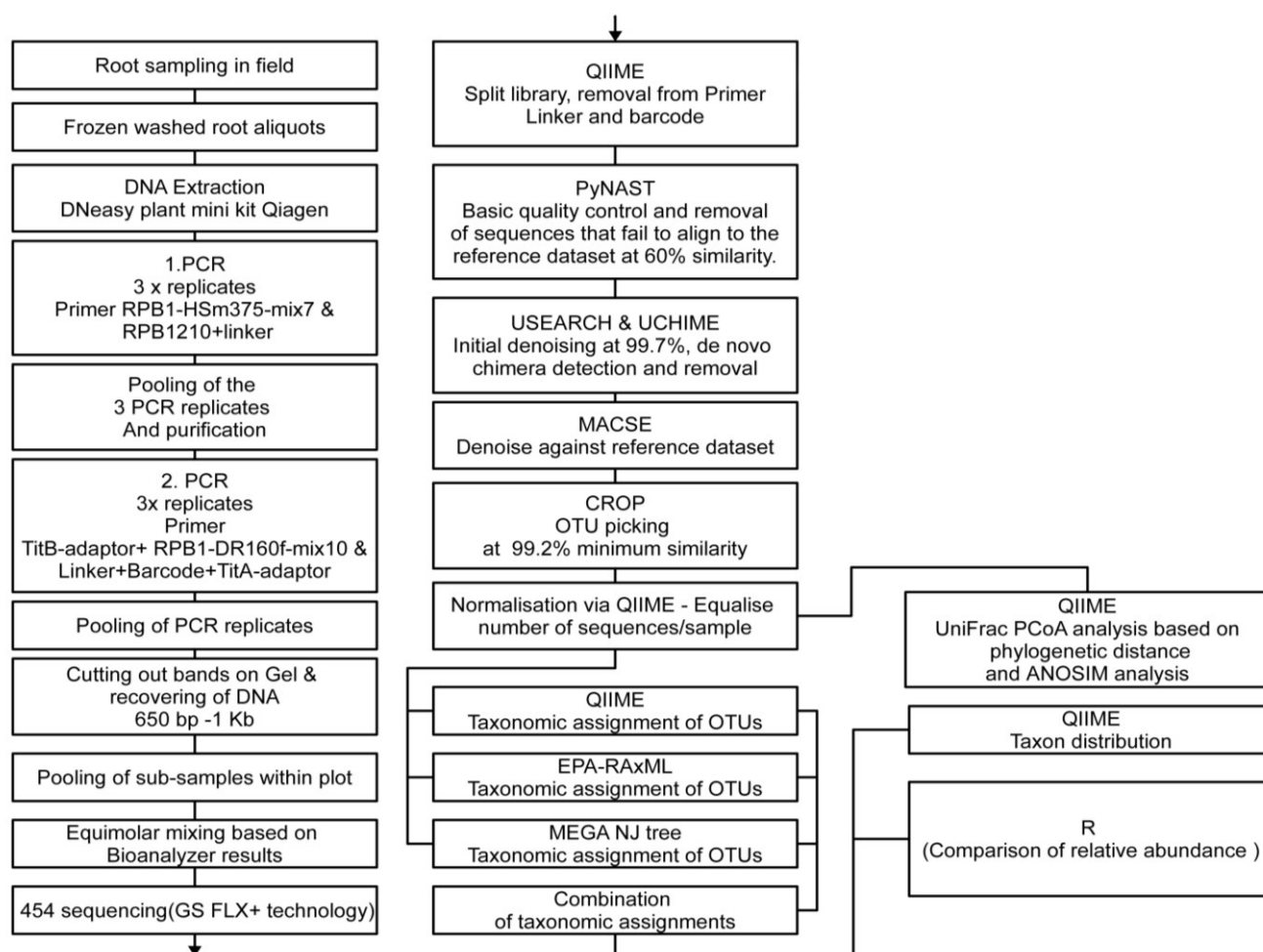
TitA+RPB1- RPB1-DR1210r			
Sample ID	TitA Adaptor 454	Barcode	Linker sequences
11.Till.B1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACGTGAC	ATCATTAAAGCAGATCTCGATCCC
12.Till.B6	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	CGTAGTAC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
13.Till.B9	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTATAGTC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
14.Till.B11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAGTGATAC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
21.No.T.B2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCTACGTAC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
22.No.T.B4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TACTCTACT	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
23.No.T.B8	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACGTATCGC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
24.No.T.B10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCACACTAC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
31.Chisel.B3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TAGTGTCTG	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
32.Chisel.B5	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTACGACT	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
33.Chisel.B7	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	ACTGTATAC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC
34.Chisel.B12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	TCACGTATC	CATTAAAGCAGATCTCGATCCC

H. 454 sequence editing and analysis

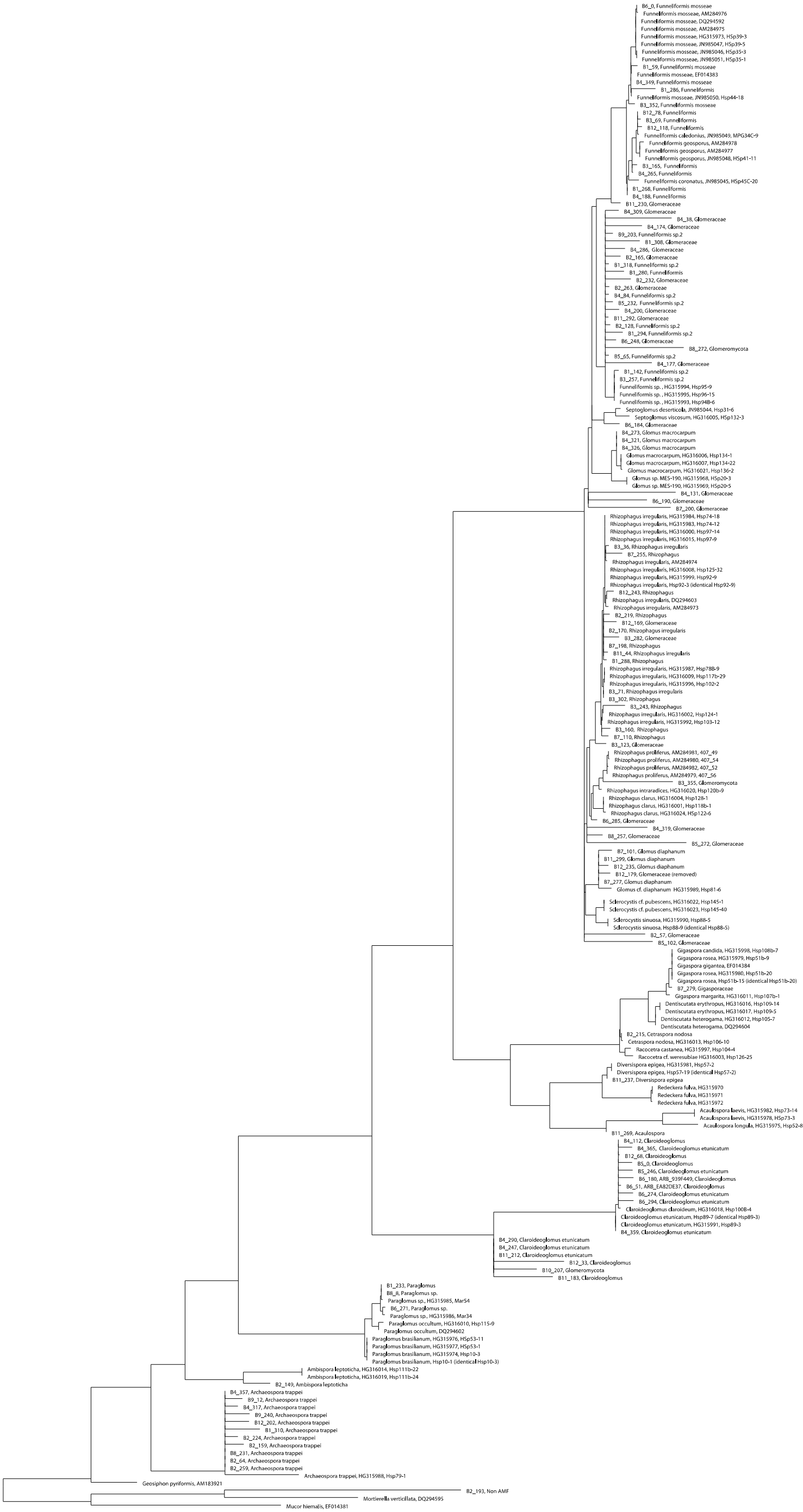
Sequences obtained from the different 1/16 regions (lanes) were pooled to maximize coverage. The data were analysed mainly with the QIIME pipeline (Caporaso *et al.*, 2010) with some modifications based on the protocol of Yu *et al.* (2012). For details of the workflow overview, see supplementary data file 1 and Supplementary Figure A.3.

Primer, linker and barcode sequences were removed from raw 454 data and split into the different libraries depending on the barcode. Sequences were filtered out if they were shorter than 200 bp or had an ambiguous nucleotide. Using PyNAST (Caporaso *et al.*, 2010), sequences were aligned with the reference alignment at a minimum similarity of 60 %. Sequences which failed to align were discarded. Then the sequences were clustered at 99.7 % similarity with USEARCH (Edgar, 2010), which increased the speed of downstream processing. De novo chimera detection was performed using UCHIME in USEARCH (Edgar, 2011). MACSE (Ranwez *et al.*, 2011)

was used to denoise sequences. MACSE allows to take advantage of protein-coding genes (such as RPB1), aligning sequences at the amino acid level to reference sequences and searching for stop codons and frame-shifts caused by homopolymer errors. OTU picking at 99.2 % similarity was performed using CROP (Hao *et al.*, 2011). The standard QIIME method was used to assign taxonomic information to each OTU using reference dataset 2. In addition, the taxonomic assignment was verified by two other methods. Firstly, the EPA of RAXML (CRAN, 2012) (Supplementary Figure A.4) was used and secondly a bootstrapped Neighbor Joining tree based on K2P distances (Supplementary Figure A.5, 1,000 x bootstrap replicates) was constructed using MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). The taxonomic assignment was verified with the latter two analyses and a consensus assignment used for further analyses. QIIME assignments were compared with EPA-RAXML and NJ analysis. If the QIIME assignment did not match or could be refined by the other two analyses, the tree-based assignment was preferred. EPA-RAXML was valued higher than NJ analysis, because it is specially developed to assign shorter sequences to a reference tree. If the three assignment methods were in disagreement, the assignment was set to a common taxonomic sublevel. In a final step, OTUs were checked for singletons, chimeric and non-glomeromycotan sequences. These sequences were excluded from further analysis.



Supplementary Figure A.3: Schematic workflow of the 454 experiment.





Supplementary Figure A.5: Reference sequences and environmental sequences representative for OTUs were combined to calculate a phylogenetic tree using Neighbor-Joining and the Kimura 2- parameter method in MEGA5. Bootstrap values from 1,000 replicates are shown next to the branches, if over 50 %. The analysis involved 198 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 462 positions in the final dataset. OTUs are labeled according to the original QIIME taxonomic assignmen

I. Community diversity analysis

For further analysis, sequences of the OTUs were aligned and a phylogenetic tree was constructed in QIIME. This tree served as the base for beta diversity and alpha diversity analyses. For further analyses, samples were normalized through equal sampling depth of 1,400 sequences per sample. Rarefaction curves analyses were performed within QIIME, based on OTUs per number of sequences. As a measure of beta-diversity, the number of reads for each OTU / total reads per sample was used. Unweighted and weighted Unifrac (Lozupone *et al.*, 2007) matrices were calculated and used for further analysis. Analysis of similarities (ANOSIM) was used to detect significant differences between the treatments. In addition, the treatments tillage and chisel were grouped and compared with the no tillage treatment. ANOSIM analyses were performed with 2000 permutations within QIIME and mothur (Schloss *et al.*, 2009), because mothur shows which treatments are significantly different. We visualized the dissimilarity matrix in a Principal Coordinates Analysis (PCoA) and analyzed the variability of the distances within and between treatments (QIIME).

III. Results

A.RPB1 as a marker gene in the *Glomeromycota*

Reference dataset 1, based on 1.5-2 kb fragments of the RPB1 gene, was used for primer design and contained a total of 30 cultured and named species and in addition two environmental sequences. Sequences of nine of these species were either partially or entirely published previously by other authors (James *et al.*, 2006; Redecker *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2012). For *Rhizophagus irregularis*, *Paraglomus occultum* and *Dentiscutata heterogama*, we could amplify this whole long fragment of RPB1 and used it for further analysis. Almost all major lineages of glomeromycotan fungi are covered, from *Paraglomus* to *Rhizophagus*, including the type species for the *Glomeromycota*, *Glomus macrocarpum* (Figure A.2).

In order to estimate intra-isolate variation of RPB1 in the *Glomeromycota*, we sequenced two (in some cases three) clones of ten isolates from a broad range of different lineages across this phylum (Figure A.2), including multiple isolates of *Rhizophagus irregularis* and *Funnelformis mosseae*. In no case did we detect a variation of more than 0.7 % over 2,138 bp (*Ambispora leptoticha*). Intra-isolate variation between two clones each of *Funnelformis mosseae* isolates LPA34 and LPA58, for instance was 0 to 0.05 %, introns included, whereas the sequences of the two isolates differed by 1.24 %. We reanalyzed some previously-published RPB1 sequences of *Rhizophagus proliferus* (Redecker *et al.*, 2006): four clones obtained by amplification using Taq polymerase (which has a higher error rate than the proof-reading enzymes we used in the present study; accession numbers AM284979.1 to AM284982.1) showed a similarity exceeding 99 % over 1,534 bp.

Figure A.1 shows that the mean K2P distance among taxa and the number of diagnostic nucleotides are the highest in the first intron. Among the exons, exon 3 and the analysed part of exon 5 showed the highest number of diagnostic nucleotides.

Barcode gap analysis (Figure A.3.a) in all cases detected a gap between the largest intraspecific and the smallest interspecific variation based on the K2P distance. However, five sequences of the species of *Gigaspora rosea*, *Gigaspora candida* and *Gigaspora gigantea* have an extremely small gap of 0.1-0.2 % K2P distance. The maximum intraspecific variation reaches a maximum of 2.1 % K2P distances in *Rhizophagus irregularis sensu lato*.

RPB1 reference dataset 2 was used for the 454 sequence analysis. It contained shorter sequences of 34 named species and four environmental clusters, spanning at least the primer pairs RPB1-DR160f and RPB1-DR1210r. Barcode gap analysis showed similar results as the longer fragment in dataset 1, and equally no sequence variation among the three species *Gigaspora rosea*, *Gigaspora gigantea* and *Gigaspora candida* (Figure A.3.b). All other groups showed a gap of at least 0.9 % K2P distance. Based on these data, we set 0.8 % as threshold for defining OTUs in the 454 data analysis.

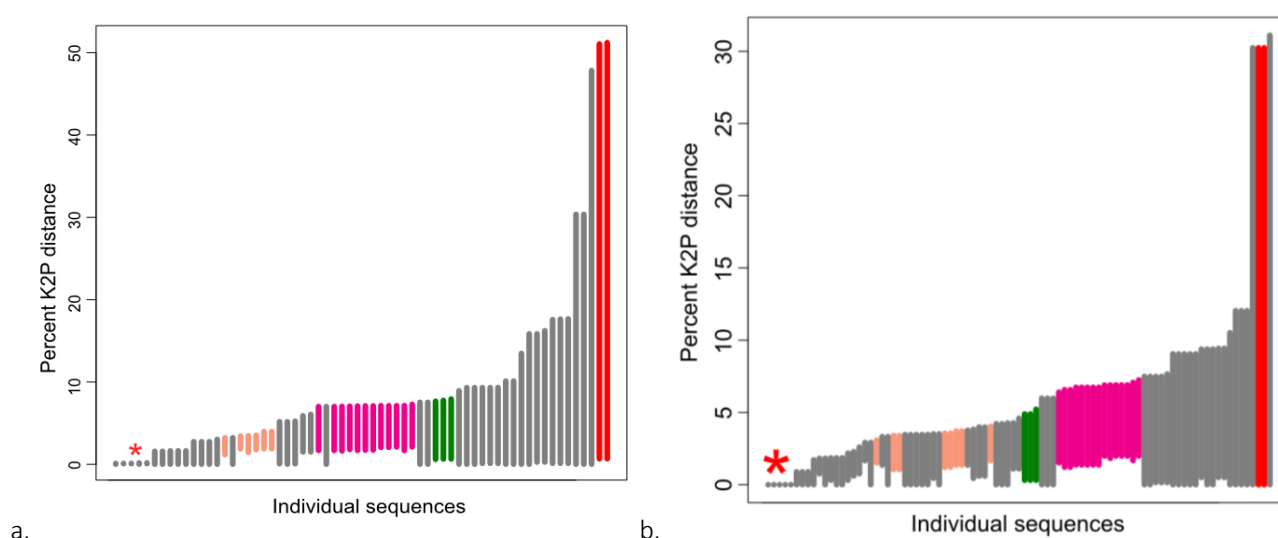


Figure A.3: Barcode gap analysis based on K2P distances of the RPB1 fragment: a. RPB1-Ac to RPB1-DR1210r and b. RPB1-160f to RPB1-DR1210r. Every sequence was plotted with its corresponding intraspecific variation and minimum interspecific variation. Bars indicate K2P difference between the maximum intraspecific (bottom) and minimum interspecific divergence (top) of each sequence. The red asterisk indicates sequences with small K2P distances of the three species *Gigaspora rosea*, *Gigaspora gigantea* and *Gigaspora candida*, which are not resolved. Two of these species are assumed to be conspecific. Colored bars represent sequences of the following species: apricot - *Funnelformis mosseae*, magenta - *Rhizophagus irregularis*, green - *Rhizophagus clarus*, red - *Ambispora leptoticha*. Bars touching zero at their lower end stand for species represented by a single sequence.

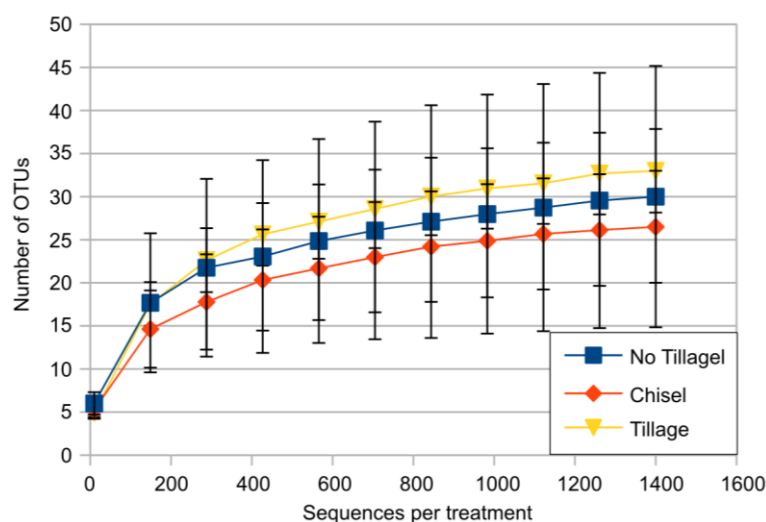
B.454 Community analysis

1. Sequences/OTUs

After removing sequences shorter than 200 bp including primers, barcode and adapters, 23,263 sequences were available for further analysis. Without primers, barcode and adapter, the sequence length range was between 145 and 515 bp, with a mean of 254 bp, whereas half of all sequences had a length of 185 to 328 bp.

After removing chimeric, non-AMF sequences and singletons, 22776 sequences were analysed. Overall, only 15 sequences of non-AMF origin were found in the dataset, corresponding to 0.06 %. Sequence numbers per

The rarefaction analysis of each sample based on observed OTUs indicated the sampling was sufficient to obtain a great majority of AMF OTUs (Supplementary Figure A.6). The total number of OTUs in each sample varies from 15 to 55 OTUs. Interestingly, both the highest and the lowest values were from no-tillage treatment samples. The four combined samples of the no-tillage treatment contained 76 OTUs, followed by the tillage and the chisel treatments, with 67 and 59 OTUs, respectively (Supplementary Table A.3).



Supplementary Figure A.6: Rarefaction curves based on number of OTUs for the three treatments: no tillage (blue), tillage (orange) and chisel (red).

Supplementary Table A.3: OTUs found in the different samples, with their taxonomic assignment.

OTU ID	Consensus Lineage				No Tillage (NT)				Chisel ©				Tillage (T)			
					NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	C 1	C 2	C 3	C 4	T 1	T 2	T 3	T 4
B2_149	Archaeosporales	Ambisporaceae	Ambispora		4		1									
B2_259	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora	Archaeospora trappei	1		1									
B2_64	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora	Archaeospora trappei	3		4									
B4_357	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora	Archaeospora trappei	42	2	289				4					
B8_231	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora	Archaeospora trappei	8		5									
B1_310	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora										4			
B12_202	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora		49		10	15	1		8	2	3		171	21
B2_159	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora		2											
B2_224	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora		3	2										
B4_317	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora		26	2										
B9_12	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora		173		16	28	1	1	4	9	138		212	26
B9_240	Archaeosporales	Archaeosporales	Archaeospora				1	1					15		51	10
B11_269	Diversisporales	Acaulosporaceae	Acaulospora		8											4
B11_237	Diversisporales	Diversisporaceae	Diversispora	Diversispora epigaea												2
B7_279	Diversisporales	Gigasporaceae	Gigaspora		403	26	656	191			5	130		1	4	72
B2_215	Diversisporales	Gigasporaceae	Racocetra	Racocetra nodosa	1	1										
B3_355	Diversisporales	Gigasporaceae				1	84	602	2	10	1			1		
B8_272	Diversisporales	Gigasporaceae					2									
B12_68	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum	34	28		2	32	64		20	1	33		53
B4_112	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum	99	52			59	88	10		19	40	21	78
B4_247	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum		54										
B4_359	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum	21	15		2	5	42		2		17	3	25
B4_365	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum	4	41			10			4	4	78	20	4
B5_0	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum		91			12	7		1	8	19	11	
B5_246	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum		3				5			5	7		3
B6_180	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum		12								51	2	
B6_274	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum		56								34		
B6_294	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum	1									14		
B6_51	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum	Cl. claroideum/etunicatum		36								3		
B10_207	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum					1		1			1		1	2
B11_183	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum							7					1	7
B11_212	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum										9	2		6
B12_33	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum				1	6		65		13	4		2	37
B4_290	Glomerales	Claroideoglomeraceae	Claroideoglossum			7								1		
B12_118	Glomerales	Glomeraceae	Funnelformis	Funnelformis caledonium		5			20	2	1	3	2	1	5	
B12_78	Glomerales	Glomeraceae	Funnelformis	Funnelformis caledonium					2			1	30	2	2	
B3_165	Glomerales	Glomeraceae	Funnelformis	Funnelformis caledonium					1				3			

OTU ID	Consensus Lineage				NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	C 1	C 2	C 3	C 4	T 1	T 2	T 3	T 4
B3_69	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis caledonium					7							
B4_265	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis caledonium		3							9			
B1_268	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis mosseae		1			1				3			
B1_59	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis mosseae									3			
B3_352	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis mosseae					5							
B4_349	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis mosseae	264	390	8		429	183	33	437	871	942	387	451
B6_0	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis mosseae		43							7	56		
B1_142	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis sp.2									8			
B1_318	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis sp.2									7			
B3_257	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis sp.2		1			8				73	14	3	
B4_84	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis	Funneliformis sp.2	81	97			26	87			84	3	10	10
B1_280	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis										2			
B1_286	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis										6			
B1_294	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		8	42			2	14			13		4	
B1_308	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis										3			
B11_230	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis													3
B11_292	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		4	1			8	3			2			1
B2_128	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		48											
B2_165	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		2									1		
B2_232	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		2											
B2_263	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		23											
B4_174	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis			4										
B4_177	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis			2										
B4_188	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis			2										
B4_200	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis			64								7		
B4_286	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis			5										
B4_309	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis			22										
B5_102	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis			11				34						
B5_232	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		16	24			5	6			130			
B5_65	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		2	1			2	2						
B6_248	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis											2		
B9_203	Glomerales	Glomeraceae	Funneliformis		9	141			56	9	1		42	14	3	2
B11_299	Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Glomus diaphanum			61	64	10	331	367	158	31		515	166
B12_235	Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Glomus diaphanum								2				
B7_101	Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Glomus diaphanum							1					2
B7_277	Glomerales	Glomeraceae	Glomus	Glomus diaphanum							1				1	
B4_273	Glomerales	Glomeraceae	Glomus			7										
B4_321	Glomerales	Glomeraceae	Glomus			18										
B4_326	Glomerales	Glomeraceae	Glomus			2										
B1_288	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis					2							

OTU ID	Consensus Lineage				NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	C 1	C 2	C 3	C 4	T 1	T 2	T 3	T 4
B11_44	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis		1			1		2	3		2		1
B12_169	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis					5		1	3	1	11		2
B12_243	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis		1			18	2	8	2		2	2	7
B2_170	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis	30	38	3		434	121	403	428	55	102	32	289
B2_219	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis	11	73	2		433	76	821	560	24	208	88	398
B3_160	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis		1			1					1		
B3_243	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis		2			2	1						
B3_282	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis					3							1
B3_302	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis		14			1							
B3_36	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis	3	9			163	11	285	14	15	72	72	136
B3_71	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis		35			2							
B7_110	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis							3					
B7_198	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis							3					
B7_255	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus	Rhizophagus irregularis							3					
B3_123	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus						3			2		2		
B6_285	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus						24					1		
B8_257	Glomerales	Glomeraceae	Rhizophagus				18		16							
B2_57	Glomerales	Glomeraceae			2	101	689	607	5	201	26			1		
B4_131	Glomerales	Glomeraceae				11	2	171		19	1					
B4_319	Glomerales	Glomeraceae				1	1	1			2					
B4_38	Glomerales	Glomeraceae				4										
B5_272	Glomerales	Glomeraceae					6			1						
B6_184	Glomerales	Glomeraceae												2		
B6_190	Glomerales	Glomeraceae			1	152	815	596	5	398	87			4		
B7_200	Glomerales	Glomeraceae				10	77	103		32	2			1		
B1_233	Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomus	Paraglomus sp.	29	1	3		3	1			11	2	4	4
B6_271	Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomus	Paraglomus sp.										5		
B8_8	Paraglomerales	Paraglomeraceae	Paraglomus	Paraglomus sp.	8		15		10			3	10	4	5	8

2. Community analysis based on UniFrac distance

The PCoA (Principal Coordinates Analysis) based on weighted UniFrac distances shows a tendency of the disturbed sites (tillage/chisel) to separate from most non-till plots (Figure A.4.a). Weighted PCoA also revealed some clustering of the tillage and chisel treatments, whereas the samples of the no-tillage treatment did not form any cluster, highlighting the heterogeneity of the different plots of this treatment (Figure A.4.b).

To validate the clustering we used ANOSIM (analysis of similarities) to analyse the different groupings. When comparing the three different treatments, the weighted UniFrac distances ANOSIM was significant at a p-value of < 0.05. Nevertheless, the R-value of 0.30 suggests a moderate separation of these three groups.

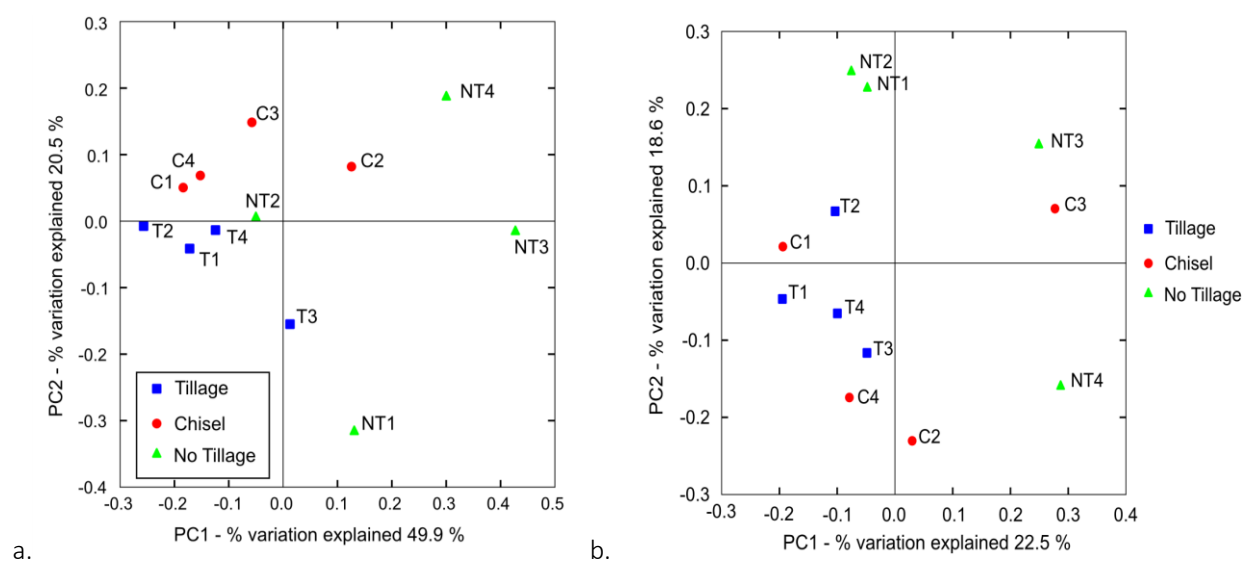


Figure A.4: Principal Coordinates Analysis of: a. weighted UniFrac distances; b. unweighted UniFrac distances.

3. Taxon identification & distribution

Because of length differences of the fragments and the relatively small reference dataset, we applied three different mapping methods: the QIIME RDP algorithm, EPA- RAXML and a NJ K2P distance tree. All three methods revealed that some species contain several OTUs. This is particularly obvious in the two well-sampled species *Rhizophagus irregularis* s.l. (one of which corresponded to the BEG141 clade, see below) and *Funnelformis mosseae*. Indeed, 14 OTUs were identified as *Rhizophagus irregularis* and six in the case of *Funnelformis mosseae*. On the other hand, other species were represented just by one OTU, such as *Cetrachora nodosa*.

Overall, we identified eight environmental molecular taxa (MTs) to species level: *Archaeospora trappei*, *Diersispora epigaea*, *Cetrachora nodosa*, *Funnelformis caledonius*, *Funnelformis mosseae*, *Glomus* cf. *diaphanum* and *Rhizophagus irregularis* (Figure A.5 & Supplementary Figure A.7). A total of ten additional unidentified species were assigned to genus level, whereas sequences of *Funnelformis* sp2 and *Paraglomus* sp. had previously been found at other sites. Although our *Claroideoglomus claroideum* and *Claroideoglomus etunicatum* isolates could be

clearly distinguished using RPB1 sequences, many sequences from the field were too short and lacked the diagnostic sites. Therefore we defined *Claroideoglossus etunicatum*/*Claroideoglossus claroideum* as one MT, distinguishing it from other, more deeply divergent *Claroideoglossus* lineages without close known relatives. The environmental molecular taxa *Glomeraceae* sp. and *Gigasporaceae* sp. had no close matches above the family level. In total, we combined the 105 OTUs to 20 species-level MTs.

In the no-tillage treatment, 19 molecular taxa (MTs) were detected, that is, all were occurring except *Diversispora epigaea*. In the tillage treatment 16 MTs were found, 15 in the chisel treatment. The chisel and the tillage treatments were dominated by *Rhizophagus irregularis* and by *Funneliformis mosseae*, respectively. These two species were strongly reduced in sequence number in the no-tillage treatment (Supplementary Figure A.7). In contrast, the sequence number of *Gigaspora* sp., *Glomeraceae* sp., and *Archaeospora trappei* increased in the no-tillage treatment (Supplementary Figure A.7). The molecular taxon *Glomeraceae* sp. dominated the no-tillage treatment. Out of 20 MTs, only five were not found in all three treatments. Four of these five were rare everywhere (that is, represented by two to 20 sequences in the experiment), only *Archaeospora trappei* was present in substantial amounts in the no-tillage treatment (212 sequences).

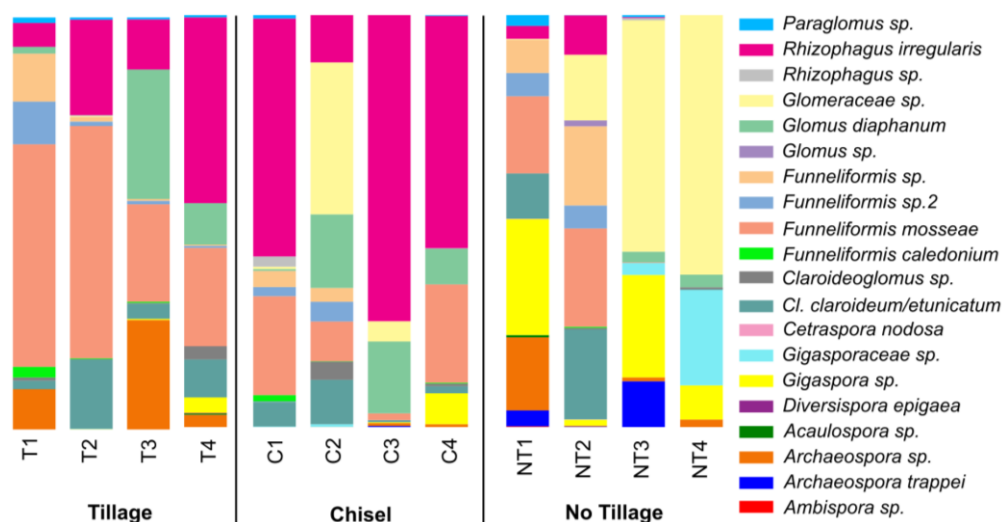
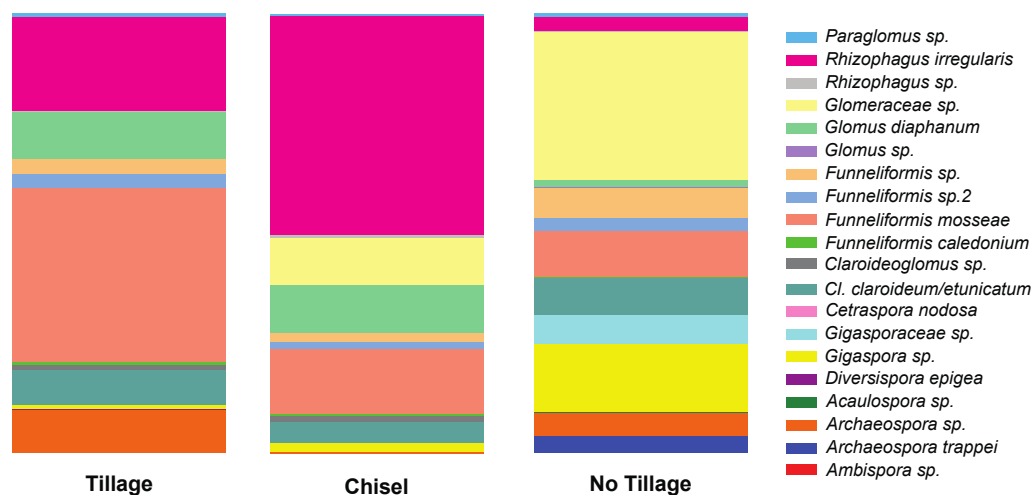


Figure A.5: Relative phylogenetic taxon distribution in the different treatments and plots.



Supplementary Figure A.7: Taxon distribution summarized by treatment.

Data file A.1: Script of the 454 data analyses based mainly on the Yu *et al.* (2012), QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) and mothur (Schloss *et al.*, 2009).

```
####Generate .qual and .fna files for each separate run.####
process_sff.py -i sffs -f
#### split library into different Barcodes#####
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output1wo/ -f sffs/1run.fna -q sffs/1run.qual -m map454_wob1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n
100000split_libraries.py -o newsplit/split_library_output2wo/ -f sffs/2run.fna -q sffs/2run.qual -m map454_wob1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n
200000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output3wo/ -f sffs/3run.fna -q sffs/3run.qual -m map454_wob1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n 300000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output4wo/ -f sffs/4run.fna -q sffs/4run.qual -m map454_wob1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n 400000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output2_1/ -f sffs/2trail_1run.fna -q sffs/2trail_1run.qual -m map454_wob1.txt -w 50 -a 0 -M 2 -r -l 200 -b 9 -
n 500000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output2_2/ -f sffs/2trail_2run.fna -q sffs/2trail_2run.qual -m map454_wob1.txt -w 50 -a 0 -M 2 -r -l 200 -b 9 -
n 600000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output1b1/ -f sffs/1run.fna -q sffs/1run.qual -m map454_onlyb1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n 1100000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output2b1/ -f sffs/2run.fna -q sffs/2run.qual -m map454_onlyb1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n 1200000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output3b1/ -f sffs/3run.fna -q sffs/3run.qual -m map454_onlyb1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n 1300000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output4b1/ -f sffs/4run.fna -q sffs/4run.qual -m map454_onlyb1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -b 9 -n 1400000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output2_1b1/ -f sffs/2trail_1run.fna -q sffs/2trail_1run.qual -m map454_onlyb1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -
b 9 -n 1500000
split_libraries.py -o newsplit/split_library_output2_2b1/ -f sffs/2trail_2run.fna -q sffs/2trail_2run.qual -m map454_onlyb1.txt -w 50 -M 2 -r -a 0 -l 200 -
b 9 -n 1600000
#### Combine all analysed seqs#####
cat *.fna > all.fas
#### Align sequences with pynast#####
align_seqs.py -i all.fas -t ref160_1210.fasta -o pynast60/ -e 100 -p 0.60
##### De novo chimera detection and initial denoising #####
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B1_seqs.fasta -p 11.Till.B1.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B6_seqs.fasta -p 12.Till.B6.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B9_seqs.fasta -p 13.Till.B9.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B11_seqs.fasta -p 14.Till.B11.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B2_seqs.fasta -p 21.No.T.B2.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B4_seqs.fasta -p 22.No.T.B4.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B8_seqs.fasta -p 23.No.T.B8.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B10_seqs.fasta -p 24.No.T.B10.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B3_seqs.fasta -p 31.Chisel.B3.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B5_seqs.fasta -p 32.Chisel.B5.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B7_seqs.fasta -p 33.Chisel.B7.Run2
filter_fasta.py -f all_seqs_aligned.fasta -o byBarcode/B12_seqs.fasta -p 34.Chisel.B12.Run2
#### Sort the files by sequence length, in preparation for the next steps.
cd byBarcode
usearch --sort B1_seqs.fasta --output B1_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B6_seqs.fasta --output B6_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B9_seqs.fasta --output B9_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B11_seqs.fasta --output B11_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B2_seqs.fasta --output B2_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B4_seqs.fasta --output B4_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B8_seqs.fasta --output B8_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B10_seqs.fasta --output B10_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B3_seqs.fasta --output B3_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B5_seqs.fasta --output B5_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B7_seqs.fasta --output B7_seqs.sorted.fasta
usearch --sort B12_seqs.fasta --output B12_seqs.sorted.fasta
#### Chimera detection and initial denoising with USEARCH: cluster by 99.7 % similarity, output the consensus sequence, sort by size of cluster, and run
a de novo chimera search for each MID file.
usearch --cluster B1_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B1_seqs.denoised.fasta --uc B1_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --
minsize 1; usearch --sortsize B1_seqs.denoised.fasta --output B1_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime
B1_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B1_seqs.nonchimeras_B1_seqs.fasta --log B1_seqs.denoised.log
usearch --cluster B2_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B2_seqs.denoised.fasta --uc B2_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --
minsize 1; usearch --sortsize B2_seqs.denoised.fasta --output B2_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime
B2_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B2_seqs.nonchimeras_B2_seqs.fasta --log B2_seqs.denoised.log
usearch --cluster B3_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B3_seqs.denoised.fasta --uc B3_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --
minsize 1; usearch --sortsize B3_seqs.denoised.fasta --output B3_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime
B3_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B3_seqs.nonchimeras_B3_seqs.fasta --log B3_seqs.denoised.log
usearch --cluster B4_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B4_seqs.denoised.fasta --uc B4_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --
minsize 1; usearch --sortsize B4_seqs.denoised.fasta --output B4_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime
B4_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B4_seqs.nonchimeras_B4_seqs.fasta --log B4_seqs.denoised.log
usearch --cluster B5_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B5_seqs.denoised.fasta --uc B5_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --
minsize 1; usearch --sortsize B5_seqs.denoised.fasta --output B5_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime
B5_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B5_seqs.nonchimeras_B5_seqs.fasta --log B5_seqs.denoised.log
usearch --cluster B6_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B6_seqs.denoised.fasta --uc B6_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --
minsize 1; usearch --sortsize B6_seqs.denoised.fasta --output B6_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime
B6_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B6_seqs.nonchimeras_B6_seqs.fasta --log B6_seqs.denoised.log
```



```
usearch --cluster B7_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B7_seqs.denoised.fasta --uc B7_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --minsize 1; usearch --sortsize B7_seqs.denoised.fasta --output B7_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime B7_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B7_seqs.nonchimeras_B7_seqs.fasta --log B7_seqs.denoised.log
usearch --cluster B8_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B8_seqs.denoised.fasta --uc B8_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --minsize 1; usearch --sortsize B8_seqs.denoised.fasta --output B8_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime B8_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B8_seqs.nonchimeras_B8_seqs.fasta --log B8_seqs.denoised.log
usearch --cluster B9_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B9_seqs.denoised.fasta --uc B9_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --minsize 1; usearch --sortsize B9_seqs.denoised.fasta --output B9_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime B9_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B9_seqs.nonchimeras_B9_seqs.fasta --log B9_seqs.denoised.log
usearch --cluster B10_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B10_seqs.denoised.fasta --uc B10_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --minsize 1; usearch --sortsize B10_seqs.denoised.fasta --output B10_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime B10_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B10_seqs.nonchimeras_B10_seqs.fasta --log B10_seqs.denoised.log
usearch --cluster B11_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B11_seqs.denoised.fasta --uc B11_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --minsize 1; usearch --sortsize B11_seqs.denoised.fasta --output B11_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime B11_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B11_seqs.nonchimeras_B11_seqs.fasta --log B11_seqs.denoised.log
usearch --cluster B12_seqs.sorted.fasta --id 0.997 --consout B12_seqs.denoised.fasta --uc B12_seqs.uc --sizeout --minlen 100 --w 50 --slots 16769023 --minsize 1; usearch --sortsize B12_seqs.denoised.fasta --output B12_seqs.denoised.sorted.fasta --minsize 1; usearch --uchime B12_seqs.denoised.sorted.fasta --nonchimeras B12_seqs.nonchimeras_B12_seqs.fasta --log B12_seqs.denoised.log
#### For later analysis, we want an OTU map that records the sequence_IDs of the reads that are members of each of the 99.7 % similarity USEARCH-OTUs created above.
#### Create a new folder for_map, put all the *.uc files into it, and then run Pick_cluster_num_V2.pl
mkdir for_map; cd for_map
mv *.uc for_map
perl Pick_cluster_num_V2.pl -id for_map -o usearch_map.txt
#### We reformat and combine the --nonchimeras output files to make them compatible for downstream analysis within the QIIME pipeline.
move all files with nonchimeras to folder "nonchimeras_fasta"
perl Replace_Seq_name_V4.pl -id nonchimeras_fasta -o usearch_all.fasta
#### change FASTA format. Make it simple. no linebreaks in the sequence####
##### MACSE denoising #####
#### we split the input file, usearch_all.fasta, to subfiles of < 1,000 reads/file####
# Move usearch_all.fasta into pdtest3 directory with the perl script
perl Split_seq.pl -i usearch_all.fasta -n 4 -od macse_split_4
# place the reference file RefExon160_1210.fasta and the MACSE program macse_v0.8b.jar in the macse_split_42 folder
# make an output folder
mkdir output
# each of the split input files is run in a different terminal session.
java -jar -Xmx4000m macse_v0.8b2.jar -i prot123_ref080812.fasta -i_lr usearch_all.1 -o output/usearch_all_1 -d 1 -f_lr -10 -s_lr -60
java -jar -Xmx4000m macse_v0.8b2.jar -i prot123_ref080812.fasta -i_lr usearch_all.2 -o output/usearch_all_2 -d 1 -f_lr -10 -s_lr -60
java -jar -Xmx4000m macse_v0.8b2.jar -i prot123_ref080812.fasta -i_lr usearch_all.3 -o output/usearch_all_3 -d 1 -f_lr -10 -s_lr -60
java -jar -Xmx4000m macse_v0.8b2.jar -i prot123_ref080812.fasta -i_lr usearch_all.4 -o output/usearch_all_4 -d 1 -f_lr -10 -s_lr -60
##### Output gives 2 file types - DNA.fasta and AA.fasta (amino acids). Place all the denoised dna.fasta files into a new folder, output_DNA, and run "Sequence_filter_V2.pl" to process the MACSE output.
perl Sequence_filter_V2.pl -id output_DNA -n 0 -o usearch_macse_all2.fasta
## We removed the reference sequences with text editor. Because the perl script "Sequence_filterV2.pl" removed some of our OTUs.##
#### MACSE also indicates likely homopolymer deletion errors with "!" characters. We simply used a text editor to remove all "!" characters and also removed remaining gap characters ("").
#### In the next step USEARCH sort the reads and remove sequences shorter than 100 bp and save as usearch_macse_all_100bpplus.fasta.
usearch --sort all_re.fas --minlen 100 --output usearch_macse_all_100bpplus.fasta
##### OTU picking using CROP #####
Pick OTUs with CROP at 99.2 % similarity. CROP runs on multiple CPUs when available.
./CROPLinux -i usearch_macse_all_100bpplus.fasta -o CROP992_DNACLUST100_otus -l 0.2 -u 0.4 -b 70 -z 500 -r 0
# Make an OTU table.
# The CROP OTU map is: CROP97_DNACLUST_otus.cluster.list
# use a text editor to replace commas in CROP97_DNACLUST_otus.cluster.list with tabs, creating CROP97_DNACLUST_otus.cluster.tab.list
# Remove "_seqs" from the name in the file usearch_map.txt
#before: B1_seqs_17 after: B1_17
# merge OTU maps to link the new CROP OTUs with the original 454 reads
merge_otu_maps.py -i usearch_map.txt,CROP992_DNACLUST100_otus.cluster.tab.list -o merged_otu992_map.txt
# Make an OTU table, which to get the number of original 454 reads per OTU
make_otu_table.py -i merged_otu992_map.txt -o merged_otu992_table.biom
##### Assign OTU to taxonomy ####
# Prepare a reference Alignment
# Make tax_id_120918.txt, with the taxonomic information for the reference Alignment
# Use representative sequences of each cluster (CROP992_DNACLUST100_otus.cluster.fasta)
assign_taxonomy.py -i CROP992_DNACLUST100_otus.cluster.fasta -r ref160_1210r.fasta -t tax_id_120918.txt -o assignedtax -m rdp -c 0.95
#### Remove non AMF form the merged_otu992_map_no_chimera.txt (B2_193)####
#### Remove a additional Chimera form the merged_otu992_map_no_chimera.txt (B12_179)####
####make OTU table with taxonomy assigned #####
make_otu_table.py -i merged_otu992_map_no_chimera.txt -t tax_assigned3.txt -o otu_table.biom
#### Remove singletons #####
filter_otus_from_otu_table.py -i otu_table.biom -o otutable_wo_s.biom -n 2
#### Remove singleton sequences form fata file #####
filter_fasta.py -f CROP992_DNACLUST100_otus.cluster.fasta -o cluster_wo_singletons.fasta -b otutable_wo_s.biom
#### check otus ####
per_library_stats.py -i otutable_wo_s.biom
##RESULTS####
```

```
Num samples: 12
Num otus: 105
Num observations (sequences): 22776.0
Seqs/sample summary:
  Min: 1425.0
  Max: 2770.0
  Median: 1810.5
  Mean: 1898.0
  Std. dev.: 347.399865669
  Median Absolute Deviation: 100.5
  Default even sampling depth in
  core_qiime_analyses.py (just a suggestion): 1632.0
Seqs/sample detail:
  21.No.T.B2.Run2: 1425.0
  13.Till.B9.Run2: 1632.0
  11.Till.B1.Run2: 1657.0
  12.Till.B6.Run2: 1763.0
  22.No.T.B4.Run2: 1769.0
  34.Chisel.B12.Run2: 1797.0
  32.Chisel.B5.Run2: 1824.0
  14.Till.B11.Run2: 1831.0
  31.Chisel.B3.Run2: 1835.0
  33.Chisel.B7.Run2: 2083.0
  24.No.T.B10.Run2: 2390.0
  23.No.T.B8.Run2: 2770.0
##### Create heat map #####
make_otu_heatmap_html.py -i otutable_wo_s.biom -o OTU_Heatmap
#### Summarize taxa#####
summarize_taxa_through_plots.py -i otutable_wo_s.biom -o wf_taxa_summary -m mapfile3.txt
#### Align sequences #####
align_seqs.py -i cluster_wo_singletons.fasta -t ref_290_1210exon_align.fasta -o pynast60/ -e 100 -p 0.60
#### Make phylogeny####
make_phylogeny.py -i cluster_wo_singletons_aligned.fasta -o rep_phylo.tre
#### Alpha diversity####
alpha_rarefaction.py -i otutable_wo_s.biom -m mapfile3.txt -o wf_arare/ -t rep_phylo.tre
#### different beta_diversity checks #####
beta_diversity_through_plots.py -i otutable_wo_s.biom -m mapfile3.txt -o wf_bdiv_even1400/ -t rep_phylo.tre -e 1400
beta_significance.py -i otutable_wo_s.biom -t rep_phylo.tre -s weighted_unifrac -o weiunfra_sig.txt -n 2000
compare_categories.py --method anosim -i weighted_unifrac_dm.txt -m mapfile3.txt -c Treatment -o anosim_weightedunifrac2 -n 2000
compare_categories.py --method anosim -i unweighted_unifrac_dm.txt -m mapfile3.txt -c Treatment -o anosim_unweightedunifrac2 -n 2000
compare_categories.py --method anosim -i weighted_unifrac_dm.txt -m mapfile3_till.txt -c Tillage -o anosim_weightedunifrac2_till -n 2000
compare_categories.py --method anosim -i unweighted_unifrac_dm.txt -m mapfile3_till.txt -c Tillage -o anosim_unweightedunifrac2_till -n 2000
####more beta diversity test with mothur####
anosim(phylip=unweighted_unifrac_dm_mothur.txt, design=enviromlist, iters=2000)
anosim(phylip=weighted_unifrac_dm_mothur.txt, design=enviromlist, iters=2000)
```

IV. Discussion

RBP1 was previously identified as a highly useful marker gene for phylogenetic analyses in addition to ribosomal genes (James *et al.*, 2006) in fungi in general, as well as in the *Glomeromycota* (Redecker and Raab, 2006). It was also tested as an alternative marker for DNA barcoding of fungi (Schoch *et al.*, 2012). Although RPB1 performed superior in that study when compared to the official DNA barcode ITS with regard to species resolving power, it was not selected as fungal DNA barcode. Indeed, one of the reasons of this preference was a considerably lower global PCR amplification success rate of RPB1 due to the lack of appropriate primers for many groups of fungi (Schoch *et al.*, 2012). In addition, the number of sequenced species in that study was relatively limited in fungi, particularly in AMF (Redecker and Raab, 2006; Schoch *et al.*, 2012). In this study, we improved the taxon sampling of RPB1 sequences in the *Glomeromycota* by providing a reference dataset of 56 sequences comprising all major lineages, based on sequences from spores from well-characterized cultures. Moreover, we designed new primers targeting subgroups of the *Glomeromycota* based on this dataset, which was essential to PCR success in this study. The new primers generated products from all samples from the Tänikon site, while at the same time a specificity of 99.94 %, which is by far superior to previous approaches using different marker genes. Depending on the study and the primers used, about 50-70 % of the sequences of nuclear ribosomal genes were reported to be of non-glomeromycotan origin (Alguacil *et al.*, 2008; Lumini *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2012).

Nuclear ribosomal LSU and ITS regions are present in numerous tandem repeats within a nucleus. The variation within the ITS region of one spore and species can be up to 20 % (Stockinger *et al.*, 2009), which is among the highest levels of variability reported in the fungal kingdom (Nilsson *et al.*, 2008). RPB1 is, to current knowledge, a single copy gene in fungi (Schoch *et al.*, 2012) and all available data, including the genome sequence of *Rhizophagus irregularis* DAOM 181602, indicate that it is monomorphic within a given AMF isolate. This fact will greatly simplify the analysis of sequence data from high-throughput sequencing analyses where numerous slightly different nuclear rDNA variants recovered from the same species are difficult to interpret. On the other hand, PCR problems that could be expected due to low copy number of RPB1 in the glomeromycotan genome were not encountered, as amplicons were obtained from all root samples (Stockinger *et al.*, 2010; Van Kuren *et al.*, 2013). Our data on *Rhizophagus irregularis* and *Funneliformis mosseae* isolates indicate that there is some polymorphism among isolates, which (in contrast to nuclear ribosomal gene regions with high intragenome polymorphism) could potentially be taken into account for estimates of genetic diversity in the field. However this may be currently difficult due to sequencing error rates. Inter-isolate variation in *Rhizophagus irregularis* in the long fragment of RPB1, including the highly variable introns, was up to 2.1 % of K2P distance. In fact, one of the introns was previously used to separate intraspecific genotypes of *Rhizophagus irregularis* (Croll *et al.*, 2008a; Croll *et al.*, 2008b). Intraspecific variation was considerably lower in the exons alone. On the other hand, the three isolates of *Rhizophagus clarus* we analyzed showed only very weak sequence divergence (0.6 % K2P distance).

The high intraspecific variation reaching a maximum of 2.1 % K2P distances in *Rhizophagus irregularis* sensu lato is partly attributable to the genetic distance between two closely-related but distinct clades, exemplified by the isolates DAOM 197198 and BEG141, respectively. Using mitochondrial rDNA sequences, it was previously shown that the BEG141 clade is well-separated (haplotypes XXII, XXIII and XXV in Börstler *et al.*, 2010) and it can be

speculated that it represents a species different from *Rhizophagus irregularis*. Defining these two groups as separate molecular species in the analyses would reduce intraspecific variation to 0 % and 1.3 %, respectively. However, it is problematic to use only these two molecular species for the analysis of the 454 field data because of the presence of additional, intermediate lineages in the *Rhizophagus irregularis* group, for which no adequate sampling of sequences is available. The BEG141 clade only accounted for very minor proportions of the *Rhizophagus irregularis* s.l. group in the field, with the only exception of one plot of the no-till treatment (BEG141 2.1 %, other *Rhizophagus irregularis* 7 % of sequences). We therefore conducted the analyses of the 454 data from the field mainly using the broad definition, well aware that *Rhizophagus irregularis* s.l. may comprise additional taxa which await further characterization.

The barcode gap of RPB1 allowed the separation of almost all morphospecies tested. Exceptions were expected for species in the genus *Gigaspora*, which also show extremely similar nuclear rDNA sequences [(Krüger *et al.*, 2012). Borriello *et al.* (2014) recently demonstrated that this is equally the case for the mitochondrially-encoded COI gene. It is well established that this complex taxon needs more thorough investigation, because these morphospecies are neither resolved with ITS nor with SSU and LSU (Krüger *et al.*, 2012). Some authors have in fact suggested that some *Gigaspora* spp. might be conspecific, which would explain this finding (J. Morton pers. comm.).

An additional advantage of using a protein-coding gene lies in the use of the respective amino acid sequence as a backbone for error correction of the pyrosequencing data (Ranwez *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Emerson *et al.*, 2011). If these errors are not corrected, diversity will be overestimated (Quince *et al.*, 2009; Reeder and Knight, 2010). The exons of the RPB1 gene are perfectly suitable for this error correction method and will provide an advantage over the rRNA gene region currently used for 454 AMF community analyses. Although the use of secondary structures of the rRNA genes as a guide for alignment is also possible (Nawrocki *et al.*, 2009), amino acid sequences can be more easily applied as guide for error corrections and alignments. Therefore it would be a great advantage to incorporate alignment tools such as MACSE, into the advanced pipelines for high-throughput sequencing analysis.

Initial community analysis, based on a 0.8 % threshold empirically obtained from the dataset as the minimum distance between morphologically defined species (except *Gigaspora*), revealed 105 OTUs, which would be certainly an overestimation of the total species in the field. After assigning our environmental sequences to known sequences, we obtained 20 assigned species-level MTs. This discrepancy is probably partly due to unequal intraspecific variation among the different clades. More sequences of characterized AMF species are necessary to define either a more suitable cut-off or use the species assignment method of RAXML and QIIME more efficiently but finding a single valid cutoff value for all lineages of *Glomeromycota* may still be elusive.

Based on analyses of spores from the field and from trap cultures, Jansa *et al.* (2002) found a total of 18 morphologically-defined species in the same field site we studied here. Our richness estimate of 20 molecular species is in the same range but it is not possible to link all morphology-based taxa of those authors to our molecular data, because of either the absence of RPB1 sequences of these species, or even (in many cases) the

non-availability of any molecular sequence. Generally, as demonstrated recently by Borriello *et al.* (2012), discrepancies are to be expected when comparing spore- and root-based approaches.

We could clearly relate three out of our seven molecularly identified species to the study of Jansa *et al.* (2002) namely *Funneliformis mosseae* (*Glomus mosseae*), *Funneliformis caledonius* (*Glomus caledonium*), and *Rhizophagus irregularis* (*Glomus intraradices*). We also detected fungi in the *Claroideoglomus claroideum/etunicatum* group, which may correspond to the *Glomus claroideum* spores reported by Jansa *et al.* (2002). Thonar *et al.* (2012) also detected *Gigaspora margarita* and *Cetraspora pellucida* (*Scutellospora pellucida*). Our analysis revealed some closely related species, and we could not confirm that the species we found (*Gigaspora* sp. and *Cetraspora nodosa*) are either conspecific or different to theirs, but it is interesting to note that *Cetraspora pellucida* (BEG153) clusters together with *Cetraspora nodosa* (BEG4) in a phylogenetic analysis based on rDNA (Krüger *et al.*, 2012).

On the other hand, a substantial proportion of the sequences we found belonged to taxa that clearly went unnoticed in the Jansa *et al.* (2002 ; 2003) studies, such as *Diversispora*, *Archaeospora*, *Ambispora* and *Paraglomus* lineages, some of which might have gone undetected due to their small spore size and low prevalence. Interestingly, the latter three genera are normally also not detected in many molecular approaches due to primer mismatches (Stockinger *et al.*, 2010). The presence of *Archaeospora* and *Ambispora* in arable soils based on molecular detection has only rarely been reported (Borriello *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2012), whereas *Paraglomus* has already been recognized as being widespread in this type of environment (Hijri *et al.*, 2006).

Dominant MT in the different treatments and their quantitative relations to a large extent correspond well to those highlighted by Thonar *et al.* (2012), but it should be kept in mind that sampling campaigns of the two studies were six years apart and we already found considerable differences among the plots (Figure A.5). In the tillage treatment, the predominant AMF was *Funneliformis mosseae*, this is in agreement with the notion of this species being a disturbance colonizer (Sýkorová *et al.*, 2007) strongly favoured by agriculture Rosendahl *et al.*, 2009). Nevertheless, *Funneliformis mosseae* spores were more abundant in fallow field in comparison to a tilled field (Rosendahl et Matzen, 2008). The most abundant MT in the chiselled plots (and the second most abundant in the tilled ones) was *Rhizophagus irregularis*. Its relatively low occurrence in the no-till treatments supports the hypothesis put forward by Börstler *et al.* (2010) that the genetic diversity of its populations is positively correlated with its abundance. These authors found the lowest population diversity of *Rhizophagus irregularis* in the non-till treatment, including some genotypes typically found in grasslands. Additionally, our analysis confirms the finding of Thonar *et al.* (2012) of a high incidence of *Gigasporaceae* species in the non-till treatments. However, the dominant symbiont in the no-till treatment was an unknown *Glomeraceae* species in this study. This fungus was not analyzed by Thonar *et al.* (2012) because of the unavailability of molecular tools targeting it. Interestingly, Borriello *et al.* (2012) found *Gigaspora* species to be equally present in tilled and in non-tilled treatments, but only in soil and never in roots.

The use of the relative numbers of 454 sequences as a measure for the abundance of taxa in pyrosequencing studies has been disputed, because of possible biases in the method, involving PCR or equimolar mixing (Amend *et al.*, 2010 ; Harris *et al.*, 2010). The present study offers the particular situation that some species

in the same study have been quantified by qPCR (Thonar *et al.*, 2012) and that these results are in very good agreement with our 454 results (Supplementary Figure A.7). We feel therefore that it is justified to carefully discuss the relative amount of sequences obtained from each of the different taxa as an approximate indication of taxon abundance. Of course possible primer biases would have to be taken into account (Kohout *et al.*, 2014), but as a single copy gene, using RPB1 in semi-quantitative or quantitative approaches would help to avoid pitfalls of copy number polymorphism which was reported even among isolates of a single AMF species (Corradi *et al.*, 2007).

Kohout *et al.* (2014) recently compared the different community compositions obtained by using rDNA primers and primer sets and concluded that the broadest taxon sample was usually obtained using primer sets and that the different systems resulted in different biases of the community.

It is interesting to note that there were few clear-cut qualitative differences among the treatments: the presence in the tillage treatment of seven out of the eight currently recognized AMF families for which RPB1 data are available, is remarkable. This paucity of clear qualitative patterns highlights the need for quantitative approaches to pick up relevant effects of soil management, such as the qPCR approach employed by Thonar *et al.* (2012). However, taxa which are not known a priori are impossible to study by qPCR, thus our non-targeted pyrosequencing approach may represent a valid compromise, as it apparently also mirrors correctly major quantitative trends revealed by qPCR. The depth of analysis possible by pyrosequencing allows to show that many AMF MTs survive at low frequencies even under adverse conditions, but also that some of them become virtually extinct by inappropriate management, even in a relatively small-scaled system such as the one studied here.

In this study, we were able to observe in PCoAs of Unifrac distance a separation between disturbance and low disturbance treatments, and even some smaller differences among the three treatments. Although the usage of UniFrac distance metric is still debated (Schloss, 2008; Lozupone *et al.*, 2011), the statistical analyses with ANOSIM show the same tendencies.

In summary, RPB1 proved to be a valuable tool to study AMF communities under field conditions which is highly likely to facilitate community analyses and contribute to a better understanding of the field ecology of this symbiosis.

Acknowledgments

The exchange of data with Diederik van Tuinen is gratefully acknowledged.

Références bibliographiques de l'Annexe 1

- Alguacil MM, Lumini E, Roldán A, Salinas-García JR, Bonfante P, Bianciotto V (2008). The impact of tillage practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in subtropical crops. *Ecological Applications* 18: 527–536.
- Amend AS, Seifert KA, Bruns TD (2010) Quantifying microbial communities with 454 pyrosequencing: does read abundance count? *Molecular Ecology* 19: 5555–5565.
- Anken T, Heusser J, Weisskopf P, Zihlmann U, Forrer H-R, Högger C, Scherrer C, Mozafar A, Sturny W (1997) Agroscope - Bodenbearbeitungssysteme. *Direktsaat stellt höchste Anforderungen. Berichte: Swiss Federal Research Station for Agriculture Economics and Engineering* 501: 1–14.
- Berger SA, Krompass D, Stamatakis A (2011) Performance, accuracy, and Web server for evolutionary placement of short sequence reads under maximum likelihood. *Systematic Biology* 60: 291–302.
- Berry D, Ben Mahfoudh K, Wagner M, Loy A (2011) Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7846–9.
- Bonfield JK, Smith KF, Staden R (1995) A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research* 23: 4992–4999.
- Borriello R, Lumini E, Girlanda M, Bonfante P, Bianciotto V (2012) Effects of different management practices on arbuscular mycorrhizal fungal diversity in maize fields by a molecular approach. *Biology and Fertility of Soils* 48: 911–922.
- Borriello R, Bianciotto V, Orgiazzi A, Lumini E, Bergero R (2014) Sequencing and comparison of the mitochondrial COI gene from isolates of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to *Gigasporaceae* and *Glomeraceae* families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 75: 1–10
- Börstler B, Thiéry O, Šýkorová Z, Berner A, Redecker D (2010) Diversity of mitochondrial large subunit rDNA haplotypes of *Glomus intraradices* in two agricultural field experiments and two semi-natural grasslands. *Molecular Ecology* 19: 1497–1511.
- Brown SDJ, Collins RA, Boyer S, Lefort M, Malumbres-Olarte J, Vink CJ, Cruickshank RH (2012) Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 12: 562–5.
- Brito I, Goss MJ, de Carvalho M, Chatagnier O, van Tuinen D (2012) Impact of tillage system on arbuscular mycorrhiza fungal communities in the soil under Mediterranean conditions. *Soil and Tillage Research* 121: 63–67.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, *et al.* (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7: 335–336.
- Corradi N, Croll D, Colard A, Kuhn G, Ehinger M, Sanders IR (2007) Gene copy number polymorphisms in an arbuscular mycorrhizal fungal population. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 366–369.
- CRAN (2012) The Comprehensive R Archive Network. Available: <http://cran.r-project.org/>. Accessed: 2012 Apr 9.
- Croll D, Corradi N, Gamper HA, Sanders IR (2008b) Multilocus genotyping of arbuscular mycorrhizal fungi and marker suitability for population genetics. *New Phytologist* 180: 564–568.
- Croll D, Wille L, Gamper HA, Mathimaran N, Lammers PJ, Corradi N, Sanders IR (2008a) Genetic diversity and host plant preferences revealed by simple sequence repeat and mitochondrial markers in a population of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 178: 672–687.
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26: 2460–2461.
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194–2200.
- Emerson BC, Cicconardi F, Fanciulli PP, Shaw PJA (2011) Phylogeny, phylogeography, phylobetadiversity and the molecular analysis of biological communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biology Sciences* 366: 2391–2402.
- Frank DN (2009) BARCRAWL and BARTAB: software tools for the design and implementation of barcoded primers for highly multiplexed DNA sequencing. *BMC Bioinformatics* 10: 362.
- Hao X, Jiang R, Chen T (2011) Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 27: 611–8.

- Harris JK, Sahl JW, Castoe TA, Wagner BD, Pollock DD, Spear JR (2010) Comparison of normalization methods for construction of large, multiplex amplicon pools for next-generation sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3863-3868.
- Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW (1998) Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431.
- Hempel S, Renker C, Buscot F (2007) Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. *Environmental Microbiology* 9: 1930–1938.
- Hijiri I, Sýkorová Z, Oehl F, Ineichen K, Mäder P, Wiemken A, Redecker D (2006) Communities of arbuscular mycorrhizal fungi in arable soils are not necessarily low in diversity. *Molecular Ecology* 15: 2277-2289.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, *et al.* (2006) Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Jansa J, Mozafar A, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2002) Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12: 225–234.
- Jansa J, Mozafar A, Kuhn G, Anken T, Ruh R, Sanders IR, Frossard E (2003) Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecological Applications* 13: 1164-1176.
- Kohout P, Sudová R, Janoušková M, Čtvrtlíková M, Hejda M, Pánková H, Slavíková R, Štajerová K, Vosátka M, Sýkorová Z (2014) Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry* 68: 482-493
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schüßler A (2012) Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193: 970–984.
- Lin X, Feng Y, Zhang H, Chen R, Wang J, Zhang J, Chu H (2012) Long-Term balanced fertilization decreases arbuscular mycorrhizal fungal diversity in an arable soil in North China revealed by 454 pyrosequencing. *Environmental Science and Technology* 46: 5764-5771.
- Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R (2007) Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1576-1585.
- Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R (2011) UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *The ISME Journal* 5: 169-172.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, *et al.* (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* 32: 1363-1371.
- Lumini E, Orgiazzi A, Borriello R, Bonfante P, Bianciotto V (2010) Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environmental Microbiology* 12: 2165–2179.
- Naumann M, Schüßler A, Bonfante P (2010) The obligate endobacteria of arbuscular mycorrhizal fungi are ancient heritable components related to the Mollicutes. *The ISME Journal* 4: 862-871.
- Nawrocki EP, Kolbe DL, Eddy SR (2009) Infernal 1.0: inference of RNA alignments. *Bioinformatics* 25: 1335-1337.
- Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N, Larsson KH (2008) Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evolutionary Bioinformatics Online* 4: 193-201.
- Öpik M, Metsis M, Daniell TJ, Zobel M, Moora M (2009) Large-scale parallel 454 sequencing reveals host ecological group specificity of arbuscular mycorrhizal fungi in a boreonemoral forest. *New Phytologist* 184: 424-437.
- Quince C, Lanzén A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM, Read LF, Sloan WT (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* 6: 639-641.
- Ranwez V, Harispe S, Delsuc F, Douzery EJP (2011) MACSE: Multiple Alignment of Coding SEquences accounting for frameshifts and stop codons. *PLOS ONE* 6: e22594.
- Redecker D and Raab PA (2006) Phylogeny of the *Glomeromycota* (arbuscular mycorrhizal fungi): recent developments and new gene markers. *Mycologia* 98: 885-895.
- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer S, Morton J, Walker C (2013) An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). *Mycorrhiza* 23(7): 515-531
- Reeder J and Knight R (2010) Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nature Methods* 7: 668-669.

- Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosendahl S and Matzen HB (2008) Genetic structure of arbuscular mycorrhizal populations in fallow and cultivated soils. *New Phytologist* 179: 1154-1161
- Rosendahl S, McGee P, Morton JB (2009) Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Molecular Ecology* 18: 4316-4329.
- Schloss PD (2008) Evaluating different approaches that test whether microbial communities have the same structure. *The ISME Journal* 2: 265-275.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, *et al.* (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-41.
- Schoch CL, Sung GH, López-Giráldez F, *et al.* (2009). The *Ascomycota* tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology* 58:224-39.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, *et al.* (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241-6246.
- Schüßler A and Walker C (2010) A species list with new families and new genera <http://www.amf-phylogeny.com>
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. Amsterdam; Boston: *Academic Press*. 800 p.
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stockinger H, Walker C, Schüßler A (2009) 'Glomus intraradices DAOM197198', a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 183: 1176-1187.
- Stockinger H, Krüger M, Schüßler A (2010) DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 187:461–474.
- Sýkorová Z, Ineichen K, Wiemken A, Redecker D (2007) The cultivation bias: different communities of arbuscular mycorrhizal fungi detected in roots from the field, from bait plants transplanted to the field, and from a greenhouse trap experiment. *Mycorrhiza* 18: 1-14.
- Sýkorová Z (2014) Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: Is there a universal solution? *Soil Biology and Biochemistry* 68: 482-493.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution* 28: 2731-2739.
- Thonar C, Erb A, Jansa J (2012) Real-time PCR to quantify composition of arbuscularmycorrhizal fungal communities—marker design, verification, calibration and field validation. *Molecular Ecology Resources* 12: 219-232.
- Tisserant E, Malbreil M, Kuo A, *et al.* (2013) Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 20117-20122.
- VanKuren NW, den Bakker HC, Morton JB, Pawlowska TE (2013) Ribosomal RNA gene diversity, effective population size, and evolutionary longevity in asexual *Glomeromycota*. *Evolution* 67: 207-224.
- Verbruggen E and Kiers ET (2010) Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evolutionary Applications* 3: 547-560.
- Walker C, Vestberg M, Demircik F, Stockinger H, Saito M, Sawaki H, Nishmura I, Schüßler A (2007) Molecular phylogeny and new taxa in the *Archaeosporales* (*Glomeromycota*): *Ambispora fennica* gen. sp. nov, *Ambisporaceae* fam. nov, and emendation of *Archaeospora* and *Archaeosporaceae*. *Mycological Research* 111: 137-153.
- Yu DW, Ji Y, Emerson BC, Wang X, Ye C, Yang C, Ding Z (2012) Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 613-623.

Résumé de la thèse

La symbiose mycorhizienne à arbuscules, dont l'apparition est conjointe à celle des plantes terrestres il y a 460 millions d'années, est une association mutualiste à bénéfices réciproques qui s'instaure entre la plupart des plantes terrestres, y compris celles cultivées, et des microorganismes ubiquitaires du sol que sont les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA, phylum des *Glomeromycota*). Lors cette symbiose, le fort potentiel d'amélioration de la nutrition minérale des plantes, et donc de la production végétale, est un atout dans le contexte mondial actuel d'augmentation de la demande de la production agricole. Afin d'optimiser les services écosystémiques des CMA dans les écosystèmes et en particulier les agroécosystèmes, la maîtrise de cette symbiose en ingénierie écologique nécessite la compréhension des mécanismes complexes qui régissent la dynamique de cette symbiose dans ces écosystèmes. Pour cela, nous avons étudié la diversité des communautés et des populations de CMA dans les agroécosystèmes à différentes échelles spatiales et sous l'influence de différentes pratiques culturales par des techniques d'empreintes moléculaires: séquençage haut-débit et polymorphisme de longueur de fragments de restriction. Les résultats obtenus montrent que la structuration de la diversité des CMA est influencée par le type d'usage de sol (prairie vs. culture), les pratiques culturales (retournement du sol, fertilisation et système de culture) ainsi que par les facteurs abiotiques (e.g. pH du sol). En conclusion, ces différents facteurs sont à prendre en compte dans l'optimisation des services écosystémiques des CMA.

Mots clés : Gloméromycètes, communauté, *Rhizophagus irregularis*, populations, séquençage haut-débit, polymorphisme de longueur de fragments de restriction, pratiques culturales, symbiose mycorhizienne.

Thesis abstract

The arbuscular mycorrhizal symbiosis, which appeared at the same time as land plants, 460 million years ago, is a mutualistic beneficial association between most land plants, including those cultivated, and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). AMF, from the *Glomeromycota* phylum, are widespread soil microorganisms needing a photosynthetic host to complete their life cycle (obligate symbionts). The great potential of plant mineral nutrition improvement and crop production increased during this symbiosis, make AMF an asset in the context of an increase in the demand of world food crop production. The control of that symbiosis by ecology engineering in order to improve ecosystem services, especially in agroecosystems, needs to better understand the mechanisms regulating its dynamic. Therefore, we studied community and population diversity of AMF under influences of different agricultural practices at several spatial scales using genetic fingerprinting methods: high-throughput sequencing and restriction fragment length polymorphism. Results show that AMF diversity is structured by land use type (grassland vs. arable fields), cultural practices (soil disturbance, fertilizations, culturing systems) as well as environmental factors (e.g. soil pH). In conclusion, those different factors have to taken in account in AMF ecosystemic service managing.

Key words: *Glomeromycota*, community, *Rhizophagus irregularis*, population, high-throughput sequencing, restriction fragment length polymorphism, cultural practices, arbuscular mycorrhiza.